

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.8.2004

REC'D 16 SEP 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 2 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 5 8 2 8 5
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 5 8 2 8 5]

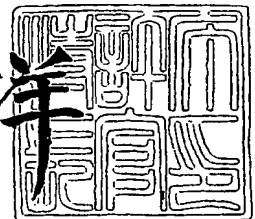
出 願 人 中 村 憲 正
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 J104040011
【提出日】 平成16年 3月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A01N
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県芦屋市大原町 20-5
 【氏名】 松田 暉
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県西宮市剣谷町 8-3
 【氏名】 澤 芳樹
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市都島区中野町 5-13-3-2804
 【氏名】 竹谷 哲
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊中市西緑丘 3-10-36-305
 【氏名】 宮川 繁
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊中市小路 2-111-1-605
 【氏名】 吉川 秀樹
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県西宮市苦楽園二番町 15-12
 【氏名】 中村 憲正
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府茨木市山手台 2-6 13-201
 【氏名】 安藤 渉
【特許出願人】
 【識別番号】 502100138
 【氏名又は名称】 株式会社カルディオ
【代理人】
 【識別番号】 100078282
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 秀策
【選任した代理人】
 【識別番号】 100062409
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安村 高明
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森下 夏樹
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-285475
 【出願日】 平成15年 8月 1日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 001878
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0210100

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

移植可能な人工組織。

【請求項 2】

三次元方向に生物学的に結合されている、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 3】

細胞を含む、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 4】

実質的に細胞および該細胞に由来する物質から構成される、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 5】

単離された、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 6】

無傷である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 7】

大型である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 8】

少なくとも約 1 cm^2 の面積を有する、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 9】

実質的に無孔である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 10】

可撓性である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 11】

伸縮性を有する、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 12】

心臓の拍動運動に耐え得る、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 13】

三次元方向すべての、生物学的結合がある、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 14】

前記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される生物学的結合を含む、請求項 13 に記載の人工組織。

【請求項 15】

臨床適用することができる組織強度を有する、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 16】

前記強度は、臨床適用が意図される部分の組織強度の少なくとも 80% 以上である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 17】

前記強度は、該人工組織が適用される組織の天然部位の最大荷重の少なくとも 50% 以上である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 18】

前記強度は、自己支持性を有するに十分である、請求項 1 に記載の人工組織。

【請求項 19】

前記自己支持性は、0.05～3.0 mm 角の先端を有するピンセットで前記人工組織をつまみあげたときに、実質的に破壊されないことを特徴とする、請求項 18 に記載の人工組織。

【請求項 20】

前記自己支持性は、手でつまみあげたときに破壊されないことを特徴とする、請求項 18 に記載の人工組織。

【請求項 21】

前記臨床適用が意図される部分は、心臓を含む、請求項 15 に記載の人工組織。

【請求項 22】

前記臨床適用が意図される部分は、滑膜、軟骨、骨、靱帯または腱を含む、請求項 16 に記載の人工組織。

【請求項 23】

前記臨床適用が意図される部分は、軟骨を含む、請求項 16 に記載の人工組織。

【請求項 24】

前記臨床適用が意図される部分は、軟骨であり、前記強度は、最大荷重が少なくとも 1.5 N である、請求項 16 に記載の人工組織。

【請求項 25】

前記臨床適用が意図される部分は、半月を含む、請求項 16 に記載の人工組織。

【請求項 26】

前記臨床適用が意図される部分は、半月であり、前記強度は、最大荷重が少なくとも 1.5 N である、請求項 16 に記載の人工組織。

【請求項 27】

人工組織を生産するための方法であって、

A) 細胞を提供する工程；

B) 該細胞を、三次元化促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；および

C) 該容器中の該細胞を、三次元化促進因子を含む細胞培養液とともに、該所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程、を包含する、方法。

【請求項 28】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 5.0 mM で存在する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 35】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 38】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 39】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、1 : 5 のモル比で含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 40】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 0.1 mM および 0.5 mM 以上含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 41】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 1.0 mM および 5.0 mM 以上含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 42】

前記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 0.1 mM の濃度で存在する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 43】

前記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 1.0 mM の濃度で存在する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 44】

前記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 5.0 mM の濃度で存在する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 45】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞～ 5×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 46】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞～ 5×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、0.5 mM～10 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 47】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 48】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、少なくとも 5 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 49】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸およびアスコルビン酸 2 リン酸を含み、該アスコルビン酸 1 リン酸は少なくとも 0.1 mM 提供され、該アスコルビン酸 2 リン酸は少なくとも 0.5 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 50】

前記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸およびアスコルビン酸 2 リン酸を含み、該アスコルビン酸 1 リン酸は少なくとも 1.0 mM 提供され、該アスコルビン酸 2 リン酸は少なくとも 5.0 mM 提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 51】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビン酸またはその塩を含む、請求項 27 に記載の方法。

。

【請求項 52】

前記容器は、温度応答性高分子でコーティングされる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 53】

前記温度応答性高分子は、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

D) 前記該人工組織を剥離させ自己収縮させる工程、をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 55】

前記剥離および自己収縮は、容器に物理的刺激を与えることにより達成される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記十分な時間は、少なくとも 3 日間である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 57】

前記十分な時間は、3 日～7 日間である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 58】

前記人工組織を分化させる工程、をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 59】

前記分化は、骨分化を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

前記骨分化は、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸 2 リン酸を含む培地中で行われる、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記分化工程は、前記細胞の提供の前または後に行われる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 62】

前記細胞は、4 継代以上の細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 63】

前記細胞は、5 継代以上の細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 64】

前記細胞は、6 継代以上の細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 65】

前記細胞は、 $7.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の以下の細胞密度で提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 66】

前記細胞は、 $5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 67】

前記細胞は、 $4.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 68】

前記細胞は、少なくとも $5.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 以上の細胞密度で提供される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 69】

前記細胞は、筋芽細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 70】

前記細胞は、脂肪細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 71】

前記細胞は、滑膜細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 72】

前記細胞は、間葉系幹細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 73】

前記間葉系幹細胞は、脂肪組織または骨髄由来である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 74】

細胞から人工組織を生産するための細胞培養組成物であって、

A) 該細胞を維持するための成分；および

B) 三次元化促進因子、

を含む、組成物。

【請求項 75】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 76】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 77】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 78】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 79】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 80】

前記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 5.0 mM で存在する、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 81】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 82】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、請求項 81 に記載の組成物。

【請求項 83】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、請求項 81 に記載の組成物。

【請求項 84】

前記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、請求項 81 に記載の組成物。

【請求項 85】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 86】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、1:5 のモル比で含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 87】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 0.1 mM および 0.5 mM 以上含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 88】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 1.0 mM および 5.0 mM 以上含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 89】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 90】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩よりアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を多く含む、請求項 89 に記載の組成物。

【請求項 91】

前記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビン酸またはその塩を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 92】

動物の生体の部分を補強するための人工組織。

【請求項 93】

前記部分は、袋状臓器を含む、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 94】

前記袋状臓器は、心臓を含む、請求項 93 に記載の人工組織。

【請求項 95】

前記部分は、骨または軟骨組織を含む、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 96】

前記部分は、半月、靱帯または腱を含む、請求項 95 に記載の人工組織。

【請求項 97】

前記補強は、前記人工組織を、前記部分を覆うように配置することによって達成される、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 98】

前記部分の伸縮に対して抵抗性を有する、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 99】

生物学的結合を有する、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 100】

前記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される、請求項 99 に記載の人工組織。

【請求項 101】

前記人工組織は、三次元化促進因子の存在下で細胞を培養することによって形成される、請求項 99 に記載の人工組織。

【請求項 102】

前記人工組織は、前記動物に由来する細胞を含む、請求項 99 に記載の人工組織。

【請求項 103】

自己支持性を有する、請求項 92 に記載の人工組織。

【請求項 104】

動物の生体の部分を補強するための方法であって、
A) 人工組織を、該部分を覆うように配置する工程；および
B) 該人工組織と該部分とが生物学的に結合するに十分な時間該人工組織を保持する工程
を包含する、方法。

【請求項 105】

前記部分は、袋状臓器を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

前記袋状臓器は、心臓を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 107】

前記人工組織は、前記部分の伸縮に対して抵抗性を有する、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 108】

前記人工組織は、生物学的結合を有する、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 109】

前記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

三次元化促進因子の存在下で細胞を培養して前記人工組織を形成する工程をさらに包含する、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 111】

前記細胞は、前記動物に由来する、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記部分は心臓であり、該心臓は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症からなる群より選択される疾患または障害を伴う、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 113】

前記部分は、骨または軟骨を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 114】

前記部分は、半月、靱帯または腱を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 115】

前記部分は骨または軟骨であり、該骨または軟骨は、損傷を受けているかまたは変性していることを特徴とする、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 116】

前記部分は骨または軟骨であり、該骨または軟骨は、難治性骨折、軟骨損傷、半月損傷、靱帯損傷、腱損傷、軟骨変性、半月変性、靱帯変性または腱変性を有することを特徴とする、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 117】

前記十分な時間は、少なくとも 10 日である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 118】

前記人工組織は、自己支持性を有する、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 119】

動物の生体の部分を処置するための方法であって、
A) 人工組織を、該部分を覆うように配置する工程；および
B) 該生体の部分の状態が改善するに十分な時間保持する工程、
を包含する、方法。

【請求項 120】

前記処置は、心臓、骨、軟骨、靱帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防、予後または強化するものであることを特徴とする、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記人工組織は、自己支持性を有する、請求項 119 に記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 機能的人工組織

【技術分野】

【0001】

本発明は、再生医療の分野に関する。より詳細には、移植後も機能する人工組織ならびにその製造法およびその利用法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年の組織工学の発達は、細胞外基質（ECM）に代わるいかなる生分解性代替物も用いずに細胞シートを三次元重層する、新規な技術を使用する機能性心臓組織の作製を可能にする見込みがある〔非特許文献1〕。この新規な技術において、細胞間接合およびコンフルエントに培養された細胞単層内の接着タンパク質の両方が、完全に保存される。そして採取法により底部を採取された細胞シートを保存した内因性ECM〔非特許文献2〕が、レシピエント心臓との統合のための接着因子として、重要な役割を果す。さらに、この心筋細胞シートは、電気伝達する拍動性3-D心臓構築物である〔非特許文献3〕。しかし、インビボ移植後に、心筋細胞シートがその機能を果すか否かは未知である。

【0003】

組織工学における最近の進歩は、種々の細胞および細胞外基質から構成される、移植可能な機能的組織を提供する可能性がある。

【0004】

臓器（例えば、心臓、血管など）の移植に外来性組織を使用する際の主な障害は免疫拒絶反応である。同種異系移植片（または同種移植片、allograft）と異種移植片（xenograft）で起こる変化が最初に記述されたのは90年以上前のことである（非特許文献4～7）。動脈移植片の拒絶反応は、病理学的には移植片の拡張（破裂に至る）または閉塞のいずれかを招く。前者の場合、細胞外マトリクスの分解により生じ、一方、後者は血管内細胞の増殖により起こる（非特許文献8）。このような移植片の使用は、材料として非生物物質を使用することが多いことから、このような副作用という弊害がある。

【0005】

最近、生体物質を利用した治療法として細胞移植が注目されている。しかし、梗塞心臓におけるヒト筋芽細胞移植は、1. 移植細胞の障害損失、2. レシピエント心の注入時の組織障害、3. レシピエント心への組織供給効率、4. 不整脈の発生、5. 梗塞部位全体への治療の困難などの欠点を有する。従って、細胞移植はそれほど成功しているとはいえない。

【0006】

従来のシートの調製方法では、あまり大型のものができないこと、生物学的結合を持った組織シートはできないことなどの欠点があり、しかもシート調製が終わった後にシャーレからはがすとぼろぼろになるなどの欠点があった。

【0007】

従って、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織またはシートを提供することが渴望されている。

【0008】

従来の技術によって調製された人工組織は、組織培養の後培養基材からの単離が困難であり、大型の組織片を作製することが実質上不可能であった。従って、従来の組織シートのような人工組織は、サイズ、構造、機械的強度などの面で医療用途における使用に耐えないという問題点があった。従来技術によって調製された人工組織は、調製自体が困難であることから、供給数が限定されているという問題点も指摘されている。

【非特許文献1】 Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y., J Biomed Mater Res. 1993; 27:1243-1251

【非特許文献2】 Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T., J Biomed. Mater. Res. 45:355-362, 1999

【非特許文献3】 Shimizu T, Yamato M, Akutsu T et al., Circ Res.2002 Feb 22;90(3):e40

【非特許文献4】 Carrel A., 1907, J Exp Med 9:226-8

【非特許文献5】 Carrel A., 1912., J Exp Med 9:389-92

【非特許文献6】 Calne RY., 1970, Transplant Proc 2:550

【非特許文献7】 Auchincloss 1988, Transplantation 46: 1

【非特許文献8】 Uretsky BF, Mulari S, Reddy S, et al., 1987, Circulation 76:827

-34

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織を提供することを課題とする。

【0010】

本発明はまた、袋状組織における損傷を治療する場合のような周囲を覆う必要がある状況において、その治療法および医薬を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記課題は、一部、本発明において三次元化促進因子を含む培地での培養という特定の培養条件によって細胞を培養することによって予想外に組織化が進展し、かつ、培養皿から剥離し易いという性質をもつ人工組織を見出したことによって解決された。

【0012】

上記課題はまた、本発明によって提供される人工組織が、例えば、孔が無い、伸縮性などの性質を持つことによって損傷部位を覆っても抵抗することができる強度を有することによって解決された。

【0013】

本発明はまた、積層化を必要としない移植可能な人工組織の生産方法を提供する。

【0014】

従って、本発明は、以下を提供する。

- (1) 移植可能な人工組織。
- (2) 三次元方向に生物学的に結合されている、項目1に記載の人工組織。
- (3) 細胞を含む、項目1に記載の人工組織。
- (4) 実質的に細胞および上記細胞に由来する物質から構成される、項目1に記載の人工組織。
- (5) 単離された、項目1に記載の人工組織。
- (6) 無傷である、項目1に記載の人工組織。
- (7) 大型である、項目1に記載の人工組織。
- (8) 少なくとも約 1 cm^2 の面積を有する、項目1に記載の人工組織。
- (9) 実質的に無孔である、項目1に記載の人工組織。
- (10) 可撓性である、項目1に記載の人工組織。
- (11) 伸縮性を有する、項目1に記載の人工組織。
- (12) 心臓の拍動運動に耐え得る、項目1に記載の人工組織。
- (13) 三次元方向すべての、生物学的結合がある、項目1に記載の人工組織。
- (14) 上記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される生物学的結合を含む、項目13に記載の人工組織。
- (15) 臨床適用することができる組織強度を有する、項目1に記載の人工組織。
- (16) 上記強度は、臨床適用が意図される部分の組織強度の少なくとも80%以上である、項目1に記載の人工組織。
- (17) 上記強度は、上記人工組織が適用される組織の天然部位の最大荷重の少なくとも50%以上である、項目1に記載の人工組織。

- (18) 上記強度は、自己支持性を有するに十分である、項目1に記載の人工組織。
- (19) 上記自己支持性は、0.05～3.0mm角の先端を有するピンセットで上記人工組織をつまみあげたときに、実質的に破壊されないことを特徴とする、項目18に記載の人工組織。
- (20) 上記自己支持性は、手でつまみあげたときに破壊されないことを特徴とする、項目18に記載の人工組織。
- (21) 上記臨床適用が意図される部分は、心臓を含む、項目15に記載の人工組織。
- (22) 上記臨床適用が意図される部分は、滑膜、軟骨、骨、靱帯または腱を含む、項目16に記載の人工組織。
- (23) 上記臨床適用が意図される部分は、軟骨を含む、項目16に記載の人工組織。
- (24) 上記臨床適用が意図される部分は、軟骨であり、上記強度は、最大荷重が少なくとも1.5Nである、項目16に記載の人工組織。
- (25) 上記臨床適用が意図される部分は、半月を含む、項目16に記載の人工組織。
- (26) 上記臨床適用が意図される部分は、半月であり、上記強度は、最大荷重が少なくとも1.5Nである、項目16に記載の人工組織。
- (27) 人工組織を生産するための方法であって、
A) 細胞を提供する工程；
B) 上記細胞を、三次元化促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；および
C) 上記容器中の上記細胞を、三次元化促進因子を含む細胞培養液とともに、上記所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程、
を包含する、方法。
- (28) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体を含む、項目27に記載の方法。
- (29) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸2リン酸またはその塩を含む、項目27に記載の方法。
- (30) 上記アスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも0.1mMで存在する、項目29に記載の方法。
- (31) 上記アスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも0.5mMで存在する、項目29に記載の方法。
- (32) 上記アスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも1.0mMで存在する、項目29に記載の方法。
- (33) 上記アスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも5.0mMで存在する、項目29に記載の方法。
- (34) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩を含む、項目27に記載の方法。
- (35) 上記アスコルビン酸1リン酸またはその塩は、少なくとも0.1mMで存在する、項目34に記載の方法。
- (36) 上記アスコルビン酸1リン酸またはその塩は、少なくとも0.5mMで存在する、項目34に記載の方法。
- (37) 上記アスコルビン酸1リン酸またはその塩は、少なくとも1.0mMで存在する、項目4に記載の方法。
- (38) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩およびアスコルビン酸2リン酸またはその塩を含む、項目27に記載の方法。
- (39) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩と、アスコルビン酸2リン酸またはその塩とを、1:5のモル比で含む、項目27に記載の方法。
- (40) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩と、アスコルビン酸2リン酸またはその塩とを、それぞれ0.1mMおよび0.5mM以上含む、項目27に記載の方法。
- (41) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩と、アスコルビ

ン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 1.0 mM および 5.0 mM 以上含む、項目 27 に記載の方法。

(42) 上記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 0.1 mM の濃度で存在する、項目 27 に記載の方法。

(43) 上記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 1.0 mM の濃度で存在する、項目 27 に記載の方法。

(44) 上記三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 5.0 mM の濃度で存在する、項目 27 に記載の方法。

(45) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞～ 5×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(46) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞～ 5×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、0.5 mM～1.0 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(47) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(48) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、少なくとも 5 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(49) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸およびアスコルビン酸 2 リン酸を含み、上記アスコルビン酸 1 リン酸は少なくとも 0.1 mM 提供され、上記アスコルビン酸 2 リン酸は少なくとも 0.5 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(50) 上記細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸およびアスコルビン酸 2 リン酸を含み、上記アスコルビン酸 1 リン酸は少なくとも 1.0 mM 提供され、上記アスコルビン酸 2 リン酸は少なくとも 5.0 mM 提供される、項目 27 に記載の方法。

(51) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビン酸またはその塩を含む、項目 27 に記載の方法。

(52) 上記容器は、温度応答性高分子でコーティングされる、項目 27 に記載の方法。

(53) 上記温度応答性高分子は、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を含む、項目 52 に記載の方法。

(54) D) 上記人工組織を剥離させ自己収縮させる工程、をさらに含む、項目 27 に記載の方法。

(55) 上記剥離および自己収縮は、容器に物理的刺激を与えることにより達成される、項目 54 に記載の方法。

(56) 上記十分な時間は、少なくとも 3 日間である、項目 27 に記載の方法。

(57) 上記十分な時間は、3 日～7 日間である、項目 27 に記載の方法。

(58) 上記人工組織を分化させる工程、をさらに含む、項目 27 に記載の方法。

(59) 上記分化は、骨分化を含む、項目 57 に記載の方法。

(60) 上記骨分化は、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸 2 リン酸を含む培地中で行われる、項目 59 に記載の方法。

(61) 上記分化工程は、上記細胞の提供の前または後に行われる、項目 27 に記載の方法。

(62) 上記細胞は、4 継代以上の細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(63) 上記細胞は、5 継代以上の細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(64) 上記細胞は、6 継代以上の細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(65) 上記細胞は、 $7.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の以下の細胞密度で提供される、項目 27 に記載の方法。

(66) 上記細胞は、 $5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される、項目 27 に記載の方法。

(67) 上記細胞は、 $4.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される、項目 27 に

記載の方法。

(68) 上記細胞は、少なくとも $5.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 以上の細胞密度で提供される、項目 27 に記載の方法。

(69) 上記細胞は、筋芽細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(70) 上記細胞は、脂肪細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(71) 上記細胞は、滑膜細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(72) 上記細胞は、間葉系幹細胞を含む、項目 27 に記載の方法。

(73) 上記間葉系幹細胞は、脂肪組織または骨髓由来である、項目 27 に記載の方法。

(74) 細胞から人工組織を生産するための細胞培養組成物であって、

A) 上記細胞を維持するための成分；および

B) 三次元化促進因子、

を含む、組成物。

(75) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体を含む、項目 74 に記載の組成物。

(76) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、項目 74 に記載の組成物。

(77) 上記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、項目 76 に記載の組成物。

(78) 上記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、項目 76 に記載の組成物。

(79) 上記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、項目 76 に記載の組成物。

(80) 上記アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩は、少なくとも 5.0 mM で存在する、項目 76 に記載の組成物。

(81) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩を含む、項目 74 に記載の組成物。

(82) 上記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.1 mM で存在する、項目 81 に記載の組成物。

(83) 上記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 0.5 mM で存在する、項目 81 に記載の組成物。

(84) 上記アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩は、少なくとも 1.0 mM で存在する、項目 81 に記載の組成物。

(85) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、項目 74 に記載の組成物。

(86) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、1:5 のモル比で含む、項目 74 に記載の組成物。

(87) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 0.1 mM および 0.5 mM 以上含む、項目 74 に記載の組成物。

(88) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 1.0 mM および 5.0 mM 以上含む、項目 74 に記載の組成物。

(89) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む、項目 74 に記載の組成物。

(90) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩よりアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を多く含む、項目 89 に記載の組成物。

(91) 上記三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビン酸またはその塩を含む、項目 74 に記載の組成物。

(92) 動物の生体の部分を補強するための人工組織。

(93) 上記部分は、袋状臓器を含む、項目92に記載の人工組織。
(94) 上記袋状臓器は、心臓を含む、項目93に記載の人工組織。
(95) 上記部分は、骨または軟骨組織を含む、項目92に記載の人工組織。
(96) 上記部分は、半月、靱帯または腱を含む、項目95に記載の人工組織。
(97) 上記補強は、上記人工組織を、上記部分を覆うように配置することによって達成される、項目92に記載の人工組織。

(98) 上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する、項目92に記載の人工組織。

(99) 生物学的結合を有する、項目92に記載の人工組織。

(100) 上記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される、項目99に記載の人工組織。

(101) 上記人工組織は、三次元化促進因子の存在下で細胞を培養することによって形成される、項目99に記載の人工組織。

(102) 上記人工組織は、上記動物に由来する細胞を含む、項目99に記載の人工組織。

(103) 自己支持性を有する、項目92に記載の人工組織。

(104) 動物の生体の部分を補強するための方法であって、

A) 人工組織を、上記部分を覆うように配置する工程；および

B) 上記人工組織と上記部分とが生物学的に結合するに十分な時間上記人工組織を保持する工程、

を包含する、方法。

(105) 上記部分は、袋状臓器を含む、項目104に記載の方法。

(106) 上記袋状臓器は、心臓を含む、項目104に記載の方法。

(107) 上記人工組織は、上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する、項目104に記載の方法。

(108) 上記人工組織は、生物学的結合を有する、項目104に記載の方法。

(109) 上記生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合および細胞間の情報伝達からなる群より選択される、項目108に記載の方法。

(110) 三次元化促進因子の存在下で細胞を培養して上記人工組織を形成する工程をさらに包含する、項目104に記載の方法。

(111) 上記細胞は、上記動物に由来する、項目110に記載の方法。

(112) 上記部分は心臓であり、上記心臓は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症からなる群より選択される疾患または障害を伴う、項目104に記載の方法。

(113) 上記部分は、骨または軟骨を含む、項目104に記載の方法。

(114) 上記部分は、半月、靱帯または腱を含む、項目104に記載の方法。

(115) 上記部分は骨または軟骨であり、上記骨または軟骨は、損傷を受けているかまたは変性していることを特徴とする、項目104に記載の方法。

(116) 上記部分は骨または軟骨であり、上記骨または軟骨は、難治性骨折、軟骨損傷、半月損傷、靱帯損傷、腱損傷、軟骨変性、半月変性、靱帯変性または腱変性を有することを特徴とする、項目104に記載の方法。

(117) 上記十分な時間は、少なくとも10日である、項目104に記載の方法。

(118) 上記人工組織は、自己支持性を有する、項目104に記載の方法。

(119) 動物の生体の部分を処置するための方法であって、

A) 人工組織を、上記部分を覆うように配置する工程；および

B) 上記生体の部分の状態が改善するに十分な時間保持する工程、

を包含する、方法。

(120) 上記処置は、心臓、骨、軟骨、靱帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防、予後または強化するものであることを特徴とする、項目119に記載の方法。

(121) 上記人工組織は、自己支持性を有する、項目119に記載の方法。

【0015】

以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および当該分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

【発明の効果】

【0016】

本発明によって、移植可能な人工組織が提供される。このような組織は、従来技術では達成不可能な大きさを達成し、しかも強度も優れていることから、従来人工物での移植処置が考えられなかった部位の処置が可能になった。本発明はまた、心筋のみならずそれ以外の部分に由来する細胞を材料として人工組織または三次元構造体を提供することが可能となった。本発明の人工組織は、生物学的結合を有しており、実際に移植治療において機能する。このような人工組織は、従来技術では提供されるものではなく、初めて提供されるものである。

【0017】

さらに、本発明のより、疾患部位を覆うことによって治療効果をもたらす医療処置が可能となった。このような処置は、覆う部分の収縮および拡張に抵抗性を有する人工組織が提供されることによって達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当上記分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0019】

(用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0020】

(再生医療)

本明細書において使用される「再生」(regeneration)とは、個体の組織の一部が失われた際に残った組織が増殖して復元される現象をいう。動物種間または同一個体における組織種に応じて、再生のその程度および様式は変動する。ヒト組織の多くはその再生能が限られており、大きく失われると完全再生は望めない。大きな傷害では、失われた組織とは異なる増殖力の強い組織が増殖し、不完全に組織が再生され機能が回復できない状態で終わる不完全再生が起こり得る。この場合には、生体内吸収性材料からなる構造物を用いて、組織欠損部への増殖力の強い組織の侵入を阻止することで本来の組織が増殖できる空間を確保し、さらに細胞増殖因子を補充することで本来の組織の再生能力を高める再生医療が行われている。この例として、軟骨、骨および末梢神経の再生医療がある。神経細胞および心筋は再生能力がないかまたは著しく低いとこれまでは考えられてきた。近年、これらの組織へ分化し得る能力および自己増殖能を併せ持った組織幹細胞（体性幹細胞）の存在が報告され、組織幹細胞を用いる再生医療への期待が高まっている。胚性幹細胞（ES細胞）はすべての組織に分化する能力をもった細胞であり、それを用いた腎臓、肝臓などの複雑な臓器の再生が試みられているが実現には至っていない。

【0021】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発

明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本発明で使用される「細胞」の数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を行うことにより細胞外マトリクス (例えば、エラスチンまたはコラーゲン) および細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積 (例えば、 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$) あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞 (例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞) であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。細胞としては、例えば、初代培養の細胞が用いられ得るが、継代培養した細胞もまた使用され得る。好ましくは、継代が4代、5代、6代またはそれ以上経過した細胞が用いられる。本明細書において、細胞密度は、単位面積 (例えば、 cm^2) あたりの細胞数で表すことができる。

【0022】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能 (すなわち多能性) (*pluripotency*) を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹 (ES) 細胞または組織幹細胞 (組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう) であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞 (たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など) もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは胚性幹細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。

【0023】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、脾 (共通) 幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞 (例えば、脂肪由来、骨髄由来) などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

【0024】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

【0025】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、脾幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような間葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、間葉系由来の細胞が使用され得る。

【0026】

本発明の人工組織、三次元構造体を構成する細胞としては、例えば、上述の外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する分化細胞または幹細胞が使用され得る。このような細胞としては、例えば、間葉系の細胞が挙げられる。ある実施形態では、このような細胞として、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、線維芽細胞、滑膜細胞などが使用され得る。このような細胞としては、分化細胞をそのまま利用したり、幹細胞をそのまま利用することもできるが、幹細胞から所望される方向に分化させた細胞を使用することができる。

【0027】

本明細書において「間葉系幹細胞」とは、間葉に見出される幹細胞をいう。本明細書ではMSCと略されることがある。ここで、間葉とは、多細胞動物の発生各期に認められる、上皮組織間の間隙をうめる星状または不規則な突起をもつ遊離細胞の集団と、それに伴う細胞間質によって形成される組織をいう。間葉系幹細胞は、増殖能と、骨細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、ストローマ細胞、腱細胞、脂肪細胞への分化能を有する。間葉系幹細胞は、患者から採取した骨髓細胞等を培養または増殖、軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化させるために使用され、または歯槽骨、関節症等の骨、軟骨、関節などの再建材料として使用されており、その需要は大きい。また、間葉系幹細胞は、血液細胞、リンパ系細胞へも分化し得ることから、その需要がますます高まっている。従って、本発明の間葉系幹細胞または分化した間葉系幹細胞を含む人工組織または三次元構造体は、これらの用途において構造体が必要である場合に特に有用である。

【0028】

本明細書において「単離された」とは、通常的环境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないことをいう。従って、単離された細胞、組織などとは、天然的环境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。組織についていう場合、単離された組織とは、その組織以外の物質（例えば、人工組織の場合は、その人工組織を作製するに際して使用された物質、足場、シート、コーティングなど）が実質的に含まれていない状態の組織をいう。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、その核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している（flanking）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

【0029】

本明細書において「無傷である」とは、人工組織、三次元構造体などについて言及する場合、物理的な外傷がないことをいい、その人工組織などを作製した後、作製に使用された環境から分離する際に与えられる物理的衝撃などによる外傷などが実質的にないことをいう。

【0030】

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。

【0031】

本明細書において、「非胚性」とは、初期胚に直接由来しないことをいう。従って、初期胚以外の身体部分に由来する細胞がこれに該当するが、胚性幹細胞に改変（例えば、遺伝的改変、融合など）を加えて得られる細胞もまた、非胚性細胞の範囲内にある。

【0032】

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色

素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

【0033】

本明細書において「組織」(tissue)とは、細胞生物において、同一の機能・形態をもつ細胞集団をいう。多細胞生物では、通常それを構成する細胞が分化し、機能が専能化し、分業化がおこる。従って細胞の単なる集合体であり得ず、ある機能と構造を備えた有機的細胞集団、社会的細胞集団としての組織が構成されることになる。組織としては、外皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の組織は、生物のどの臓器または器官由来の組織でもよい。本発明の好ましい実施形態では、本発明が対象とする組織としては、血管、血管様組織、心臓、心臓弁、心膜、硬膜、角膜、関節および骨の組織が挙げられるがそれらに限定されない。

【0034】

本明細書において「人工組織」とは、天然の状態とは異なる組織をいう。本明細書において、代表的には、人工組織は、細胞培養によって調製される。生物の中に存在する形態の組織をそのまま取り出してきたものは本明細書では人工組織とはいわない。従って、人工組織は、生体に由来する物質および生体に由来しない物質を含み得る。本発明の人工組織は、通常細胞および/または生体物質で構成されるが、それ以外の物質を含んでいてもよい。より好ましくは、本発明の人工組織は、実質的に細胞および/または生体物質のみで構成される。このような生体物質は、好ましくはその組織を構成する細胞に由来する物質(例えば、細胞外マトリクスなど)であることが好ましい。

【0035】

本明細書において「移植可能な人工組織」とは、人工組織のうちで、実際の臨床において移植することができ、移植後も少なくとも一定期間移植された部位において組織としての役割を果たすことができる人工組織をいう。移植可能な人工組織は通常、十分な強度、十分な大きさ、十分な無孔性、十分な厚み、十分な生体適合性、十分な生体定着性などを有する。

【0036】

移植可能な人工組織において十分な強度は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その強度を設定することができる。しかし、移植される場合は少なくとも一定の強度を有することが好ましく、そのような強度は、通常、引っ張り強さについて移植を目的とする部分の天然の強度の少なくとも約50%であり、好ましくは少なくとも約60%であり、より好ましくは約70%、さらに好ましくは約80%であり、もっとも好ましくは少なくとも約100%である。そのような強度は、後述の応力、歪み特性を測定したり、クリープ特性インデンテーション試験を行うことによって測定され得る。強度はまた、最大荷重を観察することによって評価され得る。

【0037】

移植可能な人工組織において十分な大きさは、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その大きさを設定することができる。しかし、移植される場合は少なくとも一定の大きさを有することが好ましく、そのような大きさは、通常、面積について少なくとも 1 cm^2 であり、好ましくは少なくとも 2 cm^2 であり、より好ましくは少なくとも 3 cm^2 である。さらに好ましくは少なくとも 4 cm^2 であり、少なくとも 5 cm^2 であり、少なくとも 6 cm^2 であり、少なくとも 7 cm^2 であり、少なくとも 8 cm^2 であり、少なくとも 9 cm^2 であり、少なくとも 10 cm^2 であり、少なくとも 15 cm^2 であり、あるいは少なくとも 20 cm^2 であり得る。

【0038】

移植可能な人工組織において十分な無孔性は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その無孔性を設定することができる。本明細書において「無孔性」とは、孔がない状態をいう。ここで、孔とは、その人工組織において体液またはその同等物(例えば、水溶液など)を漏らす程度の実質的な大きさを有する穴をいう。従って、無孔性を調べるためには、その人工組織を水平に配置し、その上に体液またはその同等物を

配置し、その体液またはその同等物が漏れないかどうかを確認し、このときに漏れない場合は無孔性であると判定することができる。

【0039】

移植可能な人工組織において十分な厚みは、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その厚みを設定することができる。しかし、移植される場合は少なくとも一定の厚みを有することが好ましく、そのような厚みは、通常、少なくとも約 $50\mu\text{m}$ であり、好ましくは少なくとも約 $100\mu\text{m}$ であり、より好ましくは約 $150\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは少なくとも約 $200\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $300\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $400\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $500\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $600\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $700\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $800\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $900\mu\text{m}$ 、少なくとも約 1mm であり得る。心臓へ移植する場合は、この最低限の厚みさえ有していればよいが、他の用途が意図される場合、厚みはより厚い方がよい場合があり得、そのような場合、例えば、少なくとも 2mm 、より好ましくは少なくとも 3mm 、さらに好ましくは 5mm であることが意図される。例えば、骨、軟骨、靱帯、腱などに適用される場合、心臓と同様に、通常、少なくとも約 $50\mu\text{m}$ であり、好ましくは少なくとも約 $100\mu\text{m}$ であり、より好ましくは約 $150\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは少なくとも約 $200\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $300\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $400\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $500\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $600\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $700\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $800\mu\text{m}$ 、少なくとも約 $900\mu\text{m}$ 、少なくとも約 1mm であり得、例えば、少なくとも 2mm 、より好ましくは少なくとも 3mm 、さらに好ましくは 5mm であってもよい。

【0040】

移植可能な人工組織において十分な生体適合性は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その生体適合性の程度を設定することができる。通常、所望される生体適合性としては、例えば、炎症などを起こさず、免疫反応を起こさず、周囲組織と生物学的結合を行うことなどが挙げられるが、それらに限定されない。場合によって、例えば、角膜などでは、免疫反応を起こしにくいことから、他の臓器において免疫反応を起こす可能性がある場合でも、本発明の目的では生体適合性を有するとすることができる。生体適合性のパラメータとしては、例えば、細胞外マトリクスの存否、免疫反応の存否、炎症の程度などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような生体適合性は、移植後における移植部位での適合性を見ること（例えば、移植された人工組織が破壊されていないことを確認する）によって判定することができる（ヒト移植臓器拒絶反応の病理組織診断基準 鑑別診断と生検標本の取り扱い（図譜）腎臓移植、肝臓移植および心臓移植 日本移植学会 日本病理学会編、金原出版株式会社（1998）を参照）。この文献によれば、Grade 0、1A、1B、2、3A、3B、4に分けられ、Grade 0 (no acute rejection) は、生検標本に急性拒絶反応、心筋細胞障害などを示す所見がない状態である。Grade 1A (focal, mild acute rejection) は、局所的、血管周囲または間質に大型リンパ球が浸潤しているが、心筋細胞傷害は無い状態である。この所見は、1つまたは複数の生検標本で認められる。Grade 1B (diffuse, mild acute rejection) は、血管周囲、間質またはその両方に大型リンパ球がよりびまん性に浸潤しているが、心筋細胞傷害は無い状態である。Grade 2 (focal, moderate acute rejection) は、明瞭に周囲と境界された炎症細胞浸潤巣がただ一箇所で見出されるような状態である。炎症細胞は、大型の活性化されたリンパ球からなり、好酸球をまじえることもある。心筋構築の改変を伴った心筋細胞傷害が病変内に認められる。Grade 3A (multifocal, moderate acute rejection) は、大型の活性化したリンパ球からなる炎症細胞浸潤巣が多発性に形成され、好酸球をまじえることもある状態である。これらの多発性の炎症性の炎症細胞浸潤巣の2箇所以上が心筋細胞傷害を伴っている。ときに、心内膜への粗な炎症細胞浸潤を伴っている。この浸潤巣は生検標本のひとつまたは複数の標本で認められる。Grade 3B (multifocal, borderline severe acute rejection) は、3Aで見られた炎症細胞浸潤巣がより融合性またはびまん性となり、より多くの生検標本で認められる状態である。大型リンパ球および好酸球、ときに好中球を交える炎症細胞浸潤とともに、心筋細胞傷害がある。出血はない。Grade 4 (sever

e acute rejection) は、活性化したリンパ球、好酸球、好中球を含む多彩な炎症細胞浸潤がびまん性に認められる。心筋細胞傷害と心筋細胞壊死とは常に存在する。浮腫、出血、血管炎も通常認められる。「Quilty」効果とは異なる心内膜への炎症細胞浸潤が通常認められる。かなりの期間、免疫抑制剤で強力に治療されている場合には、細胞浸潤よりも浮腫と出血とが顕著となり得る。

【0041】

移植可能な人工組織において十分な生体定着性は、移植を目的とする部分に依存して変動するが、当業者は適宜、その生体定着性の程度を設定することができる。生体適合性のパラメータとしては、例えば、移植された人工組織と移植された部位との生物学的結合性などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような生体定着性は、移植後における移植部位での生物学的結合の存在によって判定することができる。本明細書において好ましい生体定着性とは、移植された人工組織が移植された部位と同じ機能を発揮するように配置されていることが挙げられる。

【0042】

本明細書において「自己支持性」とは、組織（例えば、人工組織）の少なくとも1点が空間上に固定されるときに、その人工組織が実質的に破壊されない特性をいう。本明細書において、自己支持性は、0.5～3.0mmの太さの先端を有するピンセットで組織（例えば、人工組織）をつまみあげた（好ましくは、1～2mmの太さの先端を有するピンセット、1mmの太さの先端を有するピンセットで組織をつまむ；ここで、ピンセットは、先曲がりであることが好ましい）ときに、実質的に破壊されないことによって観察される。そのようなピンセットは、市販されており、例えば、夏目製作所などから入手可能である。ここで採用される、つまみ上げる力は、通常、医療従事者が組織をハンドリングする際に掛ける力に匹敵する。従って、自己支持性は、手でつまみあげたときに破壊されないという特長によっても表現することが可能である。そのようなピンセットとしては、例えば、先曲がり先細無鉤ピンセット（例えば、夏目製作所から販売される番号A-11（先端は1.0mmの太さ）、A-12-2（先端は0.5mmの太さ）などを挙げる）ができるがそれらに限定されない。先曲がりのほうがシートを摘み上げやすいが、先曲がりであることに限定されない。

【0043】

本発明では、自己支持性は、実際に人工組織を作製したときの支持性を評価することも重要である。本発明の人工組織を作製する際、容器中にシート状で人工組織が作製され、その人工組織が剥がされることになるが、剥がす際に従来技術では、人工組織が破壊されていた。従って、従来技術では、移植可能な人工組織は実質的に作製できず、特に、大型の人工組織が必要な局面では、従来技術は役に立たなかったといえる。本発明の技術を用いれば、人工組織を作製し、容器から剥がす際にも十分耐え得る強度、すなわち、自己支持性を有することから、本発明の人工組織は、実質的に任意の局面に応用可能であることが理解される。また、通常、人工組織の作製および剥離後は、その人工組織の強度および自己支持性は、上昇することが本発明において観察されたことから、本発明においては、自己支持性は、作製時における評価が一つの重要な局面であり得ることが理解される。本発明では、当然、移植局面での強度も重要であることから、作製後ある程度時間が経過した後の自己支持性を評価することも重要であり得る。

【0044】

本明細書において「膜状組織」とは、「平面状組織」ともいい、膜状の組織をいう。膜状組織には、心膜、硬膜、角膜などの器官の組織が挙げられる。

【0045】

本明細書において「臓器」と「器官」(organ)とは、互換的に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、

脾臓、脳、関節、骨、軟骨、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。このような臓器または器官はまた、表皮系、脾実質系、脾管系、肝系、血液系、心筋系、骨格筋系、骨芽系、骨格筋芽系、神経系、血管内皮系、色素系、平滑筋系、脂肪系、骨系、軟骨系などの器官または臓器が挙げられるがそれらに限定されない。

【0046】

本明細書において「袋状臓器」とは、三次元方向に一定の広がりを持ち、その臓器の内部は管状の組織によって外部と接続され得る臓器をいい、例えば、心臓、肝臓、腎臓、胃、脾臓などが挙げられる。

【0047】

1つの実施形態では、本発明が対象とする器官は、血管系に関連する臓器または器官、好ましくは虚血性の器官（心筋梗塞を起こした心臓、虚血を起こした骨格筋など）が挙げられる。1つの好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、血管、血管様組織、心臓、心臓弁、心膜、硬膜、角膜および骨である。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、心臓、心臓弁、心膜および血管である。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、軟骨、関節、骨、半月、滑膜、靱帯、腱などが挙げられるがそれらに限定されない。軟骨、半月などでは、本発明の人工組織の最大荷重は、1.5 N 程度あることが好ましいがそれらに限定されない。別の好ましい実施形態では、本発明が対象とする器官は、上記の他、骨格筋、脂肪などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0048】

本明細書において、ある部分（例えば損傷部位）の周囲に人工組織、三次元構造体などを、「巻く」とは、その人工組織などを、その部分を覆うように（すなわち、損傷などがかくれるように）配置することをいい、その部分を「覆うように配置」とすると交換可能に用いられる。ある部分を覆うように配置したかどうかは、その部分と配置された人工組織または三次元構造体などとの間の空間的配置を確認することによって判定することができる。好ましい実施形態では、巻く工程によって、ある部位にはその人工組織などが一回転するように巻き付けられることができる。

【0049】

本明細書において「人工組織と部分とが生物学的に結合するに十分な時間」は、その部分と人工組織との組み合わせによって変動するが、当業者であれば、その組み合わせに応じて適宜容易に決定することができる。このような時間としては、例えば、術後1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、1年などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、人工組織は、好ましくは実質的に細胞およびそれに由来する物質のみを含むことから、特に術後に摘出する物質が必要であるというわけではないので、この十分な時間の下限は特に重要ではない。従って、この場合、長ければ長いほど好ましいといえるが、実質的には極端に長い場合は、実質的に補強が完了したといえる。

【0050】

本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応（移植後数分以内）（ β -Galなどの抗体による免疫反応）、急性拒絶反応（移植後約7～21日の細胞性免疫による反応）、慢性拒絶反応（3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応）などが挙げられる。

【0051】

本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞（免疫系）浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

【0052】

本明細書において「石灰化」とは、生物体で石灰質が沈着することをいう。

【0053】

本明細書において生体内で「石灰化する」かどうかは、カルシウム濃度を測定することによって判定することができ、移植組織を取り出し、酸処理などにより組織切片を溶解させ、その溶液を原子吸光度などの微量元素定量装置により測定し、定量することができる。

。

【0054】

本明細書において「生体内」または「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置をいう。

【0055】

本明細書において「インビトロ」(in vitro)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0056】

本明細書において「エキソビボ」とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。

【0057】

本明細書において「細胞に由来する物質」とは、細胞を起源とする物質すべてをいい、細胞を構成する物質の他、細胞が分泌する物質。代謝した物質などをが含まれるがそれらに限定されない。代表的な細胞に由来する物質としては、細胞外マトリクス、ホルモン、サイトカインなどが挙げられるがそれらに限定されない。細胞に由来する物質は、通常、その細胞およびその細胞の宿主に対して有害な影響をもたらしなことから、そのような物質は人工組織、三次元構造体などに含まれていても通常悪影響を有しない。

【0058】

本明細書において「細胞外マトリクス」(ECM)とは「細胞外基質」とも呼ばれ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞(somatic cell)の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、通常細胞が産生し、従って生体物質の一つである。細胞外マトリクスは、組織の支持だけでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に参与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖)であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン(酸性ムコ多糖-タンパク複合体)の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のマイクロフィブリル(microfibril)、線維、細胞表面のフィブロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。本発明の1つの実施形態では、本発明の人工組織、三次元構造体などは、細胞外マトリクス(たとえば、エラスチン、コラーゲン(例えば、I型、IV型など)、ラミニンなど)は、移植が企図される器官の部位における細胞外マトリクスの組成に類似することが有利であり得る。本発明において、細胞外マトリクスは、細胞接着分子を包含する。本明細書において「細胞接着分子」(Cell adhesion molecule)または「接着分子」とは、互換可能に使用され、2つ以上の細胞の互いの接近(細胞接着)または基質と細胞との間の接着を媒介する分子をいう。一般には、細胞と細胞の接着(細胞間接着)に関する分子(cell-cell adhesion molecule)と、細胞と細胞外マトリクスとの接着(細胞-基質接着)に参与する分子(cell-substrate adhesion molecule)に分けられる。本発明の人工組織、三次元構造体は、通常、このような細胞接着分子を含む。従って、本明細書において細胞接着分子は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質(例えば、インテグリンなど)も包含され、タンパク質以外の分子であっても、細胞接着を媒介する限り、本明細書における細胞接着分子または細胞接着分子の概念に入る。

【0059】

細胞間接着に関しては、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する多くの分子（NCAM、L1、ICAM、ファシクリンII、IIIなど）、セレクトリンなどが知られており、それぞれ独特な分子反応により細胞膜を結合させることも知られている。従って、1つの実施形態では、本発明の人工組織、三次元構造体などは、このようなカドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子などの組成もまた、移植が意図される部位と同程度の組成であることが好ましい。

【0060】

このように多種多様な分子が細胞接着に関与しており、それぞれの機能は異なっていることから、当業者は、目的に応じて、適宜本発明の人工組織、三次元構造体に含まれるべき分子を選択することができる。細胞接着に関する技術は、上述のもののほかの知見も周知であり、例えば、細胞外マトリックス—臨床への応用—メディカルレビュー社に記載されている。

【0061】

ある分子が細胞接着分子であるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）、PCR法、ハイブリダイゼーション法などのようなアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。このような細胞接着分子としては、コラーゲン、インテグリン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリー（例えば、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCAM1）、セレクトリン、カドヘリンなどが挙げられるがそれに限定されない。このような細胞接着分子の多くは、細胞への接着と同時に細胞間相互作用による細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達する。従って、本発明の組織片において用いられる接着因子としては、そのような細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達するものが好ましい。細胞活性化により、組織片としてある組織または臓器における損傷部位に適用された後に、そこに集合した細胞および/または組織もしくは臓器にある細胞の増殖を促すことができるからである。そのような補助シグナルを細胞内に伝達することができるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）、PCR法、ハイブリダイゼーション法というアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。

【0062】

細胞接着分子としては、例えば、組織固着性の細胞系に広く知られる細胞接着分子としてカドヘリンがあり、カドヘリンは、本発明の好ましい実施形態において使用することができる。一方、非固着性の血液・免疫系の細胞では、細胞接着分子としては、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー分子（LFA-3、CD2、CD4、CD8、ICAM-1、ICAM2、VCAM1など）；インテグリンファミリー分子（LFA-1、Mac-1、gpIIbIIIa、p150、95、VLA1、VLA2、VLA3、VLA4、VLA5、VLA6など）；セレクトリンファミリー分子（E-セレクトリン、P-セレクトリンなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、そのような分子は、血液・免疫系の組織または臓器を処置するための特に有用であり得る。

【0063】

細胞接着分子は、非固着性の細胞が特定の組織で働くためにはその組織への接着が必要となる。その場合、恒常的に発現するセレクトリン分子などによる一次接着、それに続いて活性化されるインテグリン分子などの二次接着によって細胞間の接着は段階的に強くなると考えられている。従って、本発明において用いられる細胞接着分子としては、そのような一次接着を媒介する因子、二次接着を媒介する因子、またはその両方が一緒に使用され得る。

【0064】

本明細書において「組織損傷率」とは、組織または器官の機能を示すパラメータをいい、処理後の組織または器官がどの程度損なわれ傷ついているかの指標であり、その組織または器官の本来の機能を発揮することができるかどうかの指標である。本明細書において

組織損傷率を測定する方法は、当該分野において公知であり、例えば、エラスチン断裂部位を計数することによって判定することができる。本明細書において用いられる方法では、一視野を $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ ごとのユニットに区切り、ユニットを単位としてエラスチン断裂部位がある場合にカウントして算出した。一視野あたり 24 ユニットが存在した。HE 染色により組織切片における細胞外マトリクスの検鏡により計数し、未処理組織を 0% となるように規定し、損傷率 = $x/24$ で算出する。この場合未処理を $x=0$ として規定する。

【0065】

本明細書において「組織強度」とは、組織または器官の機能を示すパラメータをいい、その組織または器官の物理的強度である。組織強度は一般に、引っ張り強さ（例えば、破断強度、剛性率、ヤング率など）を測定することによって判定することができる。そのような一般的な引っ張り試験は周知である。一般的な引っ張り試験によって得られたデータの解析により、破断強度、剛性率、ヤング率などの種々のデータを得ることができ、そのような値もまた、本明細書において組織強度の指標として用いることができる。本明細書では、通常、臨床適用することができる程度の組織強度を有することが必要とされる。

【0066】

ここで、本発明の人工組織、三次元構造体などが有する引っ張り強さは、応力・歪み特性を測定することによって測定することができる。手短に述べると、試料に荷重を加え、例えば、1ch は歪み、2ch は荷重の各々の AD 変換器（例えば、ELK-5000）に入力して、応力および歪みの特性を測定することによって引っ張り強さを決定することができる（図 40）。引っ張り強さはまた、クリープ特性を試験することによっても達成することができる。クリープ特性インデンテーション試験とは、一定の荷重を加えた状態で時間とともにどのように伸びていくかを調べる試験である。微小な素材、薄い素材などのインデンテーション試験は、先端の半径 0.1 ~ $1\mu\text{m}$ 程度の、例えば、三角錐の圧子を用いて実験を行う。まず、試験片に対して圧子を押し込み、付加を与える。そして、試験片に数十 nm から数 μm 程度押し込んだところで、圧子を戻し除荷する。このような試験方法によって得られる荷重除荷曲線を図 41 に示す。この曲線から得られた負荷荷重と押し込み深さの挙動とによって硬さ、ヤング率などを求めることができる。

【0067】

1 つの好ましい実施形態では、本発明の人工組織、三次元構造体があり得る引っ張り強さは、通常移植を目的とする部分の天然の強度の少なくとも約 50% であり、好ましくは少なくとも約 60% であり、より好ましくは約 70%、さらに好ましくは約 80% であり、もっとも好ましくは少なくとも約 100% である。

【0068】

あるいは、ある実施形態において、本発明の人工組織は、天然の組織（例えば、臨床適用が意図される部分（例えば、心臓など））があり得る組織強度の少なくとも約 75% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 85% 以上、さらに好ましくは約 90% 以上であり得、あるいは、好ましくは少なくとも約 100% であり得、天然の組織があり得る組織強度以上の値を有していてもよい。ここで、天然の組織があり得る組織強度とは、その天然での状態で所望の目的の組織があり得る組織強度をいう。十分に強い組織強度は、膜状以外の組織（例えば、管状組織）を適用する場合にも有することが好ましい特性である。管状組織の場合、組織強度は、 β 値で表すことができる。 β 値の算出方法は、本明細書の別の場所において詳述し、実施例においても例示した。ある実施形態において、本発明の人工組織は、約 15 以上の β 値の組織強度を有し、好ましくは、約 18 以上の β 値の組織強度を有し、より好ましくは約 20 以上の β 値の組織強度を有し、さらに好ましくは約 22 以上の β 値の組織強度を有する。別の実施形態において、本発明の人工組織は、処理前の組織があり得る β 値の少なくとも約 75% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 85% 以上、さらに好ましくは約 90% 以上であり得、未処理状態での（もともと有していた） β 値以上の値を有していてもよい。ここで、組織が未処理状態での特性（例えば、 β 値）とは、その組織の処理（例えば、本発明の 1, 2-エポキシド高分子での

処理)の前(例えば、天然での状態)で有していた特性をいう。従って、例えば、もともとの組織が25の β 値を有していた場合は、好ましくは、本発明の人工組織は、17.5以上、好ましくは20以上、より好ましくは21.25以上、さらに好ましくは22.5以上の β 値を有し得る。

【0069】

本明細書において管状組織の場合、組織強度は、剛性パラメータ(β 値)で表現することができる。 β 値は、 $P-D$ (圧力-直径)関係を作成した後、

$$\ln(P/P_s) = \beta(D/D_s - 1) \quad (1)$$

で算出することができる。 P_s および D_s は、100 mmHgでの標準値を示す。 P および D 各々の P (圧力)における直径(D)の値を示す。

【0070】

血管などの管状組織の両端をパイプ状のユニットに固定し、生理食塩水中に内室および外室を満たす。この状態から、内室へ圧力を外武装置より加えていくと同時に、その加圧時の外径をモニタリングする。その測定によって得られる圧力と、外径との関係を上記(1)の式に導入して、 β 値を算出する(Sonoda H, Takamizawa K. et al. J. Biomed. Mater. Res. 2001:266-276)。

【0071】

本明細書において「生理活性物質」(physiologically active substance)とは、細胞または組織に作用する物質をいう。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたものでもよい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものである。本明細書では、生理活性物質はタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。本発明において、生理活性物質は、本発明の人工組織の移植の際に、定着を促進するためなどに使用され得る。

【0072】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制御作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

【0073】

本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。

【0074】

サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝実質細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)のような増殖活性を有するものが挙げられる。

【0075】

サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象(redundancy)があることから、他の名称および機能で知られるサイトカインまたは増殖因子であっても、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本明細書における好ましい活性を有

してさえいれば、本発明の治療法または医薬の好ましい実施形態において使用することができる。

【0076】

従って、1つの実施形態において、本発明は、このようなサイトカインまたは増殖因子（例えば、HGF）を、移植部位（例えば心筋移植部位）に本発明の人工組織または三次元構造体と同時に投与することによって、人工組織または三次元構造体の定着および移植部位の機能向上が見られることが明らかにされ、そのような併用療法を提供する。

【0077】

本明細書において「分化」とは、細胞、組織または器官のような生物の部分の状態の発達過程であって、特徴のある組織または器官を形成する過程をいう。「分化」は、主に発生学（embryology）、発生生物学（developmental biology）などにおいて使用されている。1個の細胞からなる受精卵が分裂を行い成体になるまで、生物は種々の組織および器官を形成する。分裂前または分裂が十分でない場合のような生物の発生初期は、一つ一つの細胞や細胞群が何ら形態的または機能的特徴を示さず区別することが困難である。このような状態を「未分化」とであるという。「分化」は、器官のレベルでも生じ、器官を構成する細胞がいろいろの違った特徴的な細胞または細胞群へと発達する。これも器官形成における器官内での分化という。従って、本発明の人工組織、三次元構造体は、分化した状態の細胞を含む組織を用いてもよい。本発明の人工組織を作製する場合、分化が必要な場合は、組織化を始める前に分化させてもよく、組織化の後に分化させても良い。

【0078】

本明細書において「分化因子」とは、「分化促進因子」ともいい、分化細胞への分化を促進することが知られている因子（例えば、化学物質、温度など）であれば、どのような因子であってもよい。そのような因子としては、例えば、種々の環境要因を挙げることができ、そのような因子としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、化学物質（例えば、ステロイド、抗生物質など）などまたはそれらの任意の組み合わせが挙げられるがそれらに限定されない。代表的な分化因子としては、細胞生理活性物質が挙げられるがそれらに限定されない。そのような因子のうち代表的なものとしては、DNA脱メチル化剤（5-アザシチジンなど）、ヒストン脱アセチル化剤（トリコスタチンなど）、核内レセプターリガンド（例えば、レチノイン酸（ATRA）、ビタミンD₃、T₃など）、細胞増殖因子（アクチビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF- β 、BMP2/4など）、サイトカイン（LIF、IL-2、IL-6など）、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチルcAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、酪酸ナトリウム、アフィディコリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0079】

具体的な分化因子としては、以下が挙げられる。これらの分化因子は、単独でまたは組み合わせで用いられ得る。

【0080】

- A) 角膜：上皮増殖因子（EGF）；
- B) 皮膚（ケラチノサイト）：TGF- β 、FGF-7（KGF：keratinocyte growth factor）、EGF
- C) 血管内皮：VEGF、FGF、アンギオポエチン（angiopoietin）
- D) 腎臓：LIF、BMP、FGF、GDNF
- E) 心臓：HGF、LIF、VEGF
- F) 肝臓：HGF、TGF- β 、IL-6、EGF、VEGF
- G) 臍帯内皮：VEGF
- H) 腸管上皮：EGF、IGF-I、HGF、KGF、TGF- β 、IL-11
- I) 神経：神経成長因子（NGF）、BDNF（脳由来神経栄養因子）、GDNF（グ

リア細胞由来神経栄養因子)、ニューロトロフィン (neurotrophin)、IL-6、TGF- β 、TNF

J) グリア細胞: TGF- β 、TNF- α 、EGF、LIF、IL-6

K) 末梢神経細胞: bFGF、LIF、TGF- β 、IL-6、VEGF、

L) 肺 (肺胞上皮): TGF- β 、IL-13、IL-1 β 、KGF、HGF

M) 胎盤: 成長ホルモン (GH)、IGF、プロラクチン、LIF、IL-1、アクチビンA、EGF

N) 脾臓上皮: 成長ホルモン、プロラクチン

O) 脾臓ランゲルハンス氏島細胞: TGF- β 、IGF、PDGF、EGF、TGF- β 、TRH (thyrotropin)

P) 関節滑膜上皮: FGF、TGF- β

Q) 骨芽細胞: BMP、FGF

R) 軟骨芽細胞: FGF、TGF- β 、BMP、TNF- α

S) 網膜細胞: FGF、CNTF (絨毛神経栄養因子 = ciliary neurotrophic factor)

T) 脂肪細胞: インスリン、IGF、LIF

U) 筋肉細胞: LIF、TNF- α 、FGF。

【0081】

本明細書において「骨分化」とは、任意の細胞を骨に分化させることをいう。そのような骨分化は、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸2リン酸の存在下で促進されることが知られる。

【0082】

本明細書において「移植片」、「グラフト」および「組織グラフト」は、交換可能に用いられ、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となるものをいう。従って、本発明の人工組織、三次元構造体は、移植片として用いることができる。移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓、心臓弁、心膜、硬膜、関節膜、骨片、軟骨片、角膜骨片、歯などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー (donor) の種類によって、自己 (自家) 移植片 (autograft)、同種移植片 (同種異系移植片) (allograft)、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。

【0083】

本明細書において自己移植片 (組織、細胞、臓器など) または自家移植片 (組織、細胞、臓器など) とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する移植片 (組織、細胞、臓器など) をいう。本明細書において自己移植片 (組織、細胞、臓器など) というときは、広義には遺伝的に同じ他個体 (例えば一卵性双生児) からの移植片 (組織、細胞、臓器など) をも含み得る。本明細書では、このような自己との表現は、被験体に由来すると交換可能に使用される。従って、本明細書では、ある被験体に由来しないとの表現は、自己ではない (すなわち、非自己) と同一の意味を有する。

【0084】

本明細書において同種移植片 (同種異系移植片) (組織、細胞、臓器など) とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される移植片 (組織、細胞、臓器など) をいう。遺伝的に異なることから、同種異系移植片 (組織、細胞、臓器など) は、移植された個体 (レシピエント) において免疫反応を惹起し得る。そのような移植片 (組織、細胞、臓器など) の例としては、親由来の移植片 (組織、細胞、臓器など) などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0085】

本明細書において異種移植片 (組織、細胞、臓器など) とは、異種個体から移植される移植片 (組織、細胞、臓器など) をいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場

合、ブタからの移植片（組織、細胞、臓器など）は異種移植片（組織、細胞、臓器など）という。

【0086】

本明細書において「レシピエント」（受容者）とは、移植片（組織、細胞、臓器など）または移植体（組織、細胞、臓器など）を受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植片（組織、細胞、臓器など）または移植体（組織、細胞、臓器など）を提供する個体は、「ドナー」（供与者）という。

【0087】

本発明の人工組織形成技術を用いれば、どのような細胞に由来する人工組織でも使用することができる。なぜなら、本発明の方法により形成された人工組織（例えば、膜状組織、器官など）は、治療目的に損傷のない程度の組織損傷率を保持しつつ（すなわち、低く保ちながら）、目的の機能を発揮することができるからである。従って、従来そのままの組織または臓器自体を移植体として使用するしかなかった状況にあった。このような状況において、細胞から三次元的に結合した組織を形成することができたことによって、そのような三次元的な人工組織を用いることが可能になったことは、従来技術では達成することができなかった本発明の格別の効果の一つといえる。

【0088】

本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

【0089】

本発明の人工組織、三次元構造体、組織グラフトで必要に応じて使用される細胞は、同系由来（自己（自家）由来）でも、同種異系由来（他個体（他家）由来）でも、異種由来でもよい。拒絶反応が考えられることから、自己由来の細胞が好ましいが、拒絶反応が問題でない場合同種異系由来であってもよい。また、拒絶反応を起こすものも必要に応じて拒絶反応を解消する処置を行うことにより利用することができる。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、第12巻、臓器移植（心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて）（改訂第3版）、中山書店に記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオール）、「タクロリムス」（プロGRAF）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の医薬と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の再生・治療方法の前または後にも投与され得る。

【0090】

本発明で用いられる細胞は、どの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の細胞でもよい。好ましくは、脊椎動物由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類由来の細胞が用いられる。最も好ましい実施形態において、ヒト由来の細胞が用いられる。通常は、宿主と同じ種の細胞を用いることが好ましい。

【0091】

本発明が対象とする被験体と、人工組織との組合せとしては、例えば、心疾患（例えば、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症など）を起こした心臓への移植、心膜パッチ、脳外科手術時の硬膜移植、心筋梗塞、下肢、上肢などへの血管移植、関節異常、軟骨異常、骨折、骨欠損を有する患者への関節、軟骨、骨の移植、損傷した角膜を有する患者に本発明の角膜を移植することなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0092】

本発明が対象とする組織は、生物のどの臓器または器官でもよく、また、本発明が対象とする組織は、どのような種類の生物由来であり得る。本発明が対象とする生物としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。好ましくは、本発明が対象とする生物は、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）である。より好ましくは、本発明が対象とする生物は、霊長類である。最も好ましくは、本発明はヒトを対象とする。

【0093】

本発明の人工組織、三次元構造体などを弁として使用する場合、そのような弁の一般的使用について、当該分野において周知の技術を応用して移植などを行うことができる。例えば、ステントレス異種生体弁が当該分野においてよく知られている。異種生体弁では、ステントの存在で有効な弁口面積が小さくなり、また弁葉の石灰化や変性が問題であった。最近、ブタ大動脈基部の形態を生かし、ステントを用いないステントレス異種生体弁が大動脈弁位の人工弁として注目されている（Gross C. et al., Ann Thorac Surg 68:919, 1999）。ステントがないことで、小さいサイズの弁を使用せざるを得ない場合でも弁を介した圧較差が少なく、術後の左心室肥大に対しても有効であると考えられている。また大動脈の基部の弾性が維持され、弁尖にかかるストレスが少なくステント付き生体弁に比較して耐久性の向上も期待できる。さらに、感染による心内膜炎、人工弁感染時にも使用が可能である。現在欧米でのステントレス異種生体弁の中期術後成績は十分に満足できる報告がなされており、長期成績にも期待できる（Gross C. et al., Ann Thorac Surg 68:919, 1999）。

【0094】

本明細書において「大型」とは、人工組織に関して言及するとき、孔がない部分の大きさをいい、代表的には、孔がない部分の長手方向の長さが少なくとも1 cm、好ましくは少なくとも1.5 cm、さらに好ましくは少なくとも2 cmであることを意味する。この場合、短手方向の長さもまた、少なくとも1 cm、好ましくは少なくとも1.5 cm、さらに好ましくは少なくとも2 cmであることが好ましいが必ずしもそうである必要はない。面積で表す場合、孔がない部分の内接円の面積が通常少なくとも1 cm²であり、好ましくは少なくとも2 cm²であり、より好ましくは少なくとも3 cm²であり、さらに好ましくは少なくとも4 cm²であり、なおさらに好ましくは少なくとも5 cm²であり、最も好ましくは少なくとも6 cm²である。

【0095】

本明細書において「可撓性」の人工組織とは、外的環境からの物理的刺激（例えば、圧力）などに対して、抵抗性を有することをいう。可撓性を有する人工組織は、移植される部位が、自律的にまたは他からの影響で運動したり変形したりする場合に好ましい。従って、そのような可撓性を有する人工組織は、移植された後も、可撓性を有することが好ましい。

【0096】

本明細書において「伸縮性」を有する人工組織とは、外的環境からの伸縮性の刺激（例えば、拍動）に対して抵抗性を有する性質をいう。伸縮性を有する人工組織は、移植される部位が伸縮性の刺激を伴う場合好ましい。そのような伸縮性の刺激を伴う部位としては、例えば、心臓、筋肉、関節、軟骨、腱などが挙げられるがそれらに限定されない。1つの実施形態では、心臓の拍動運動に耐え得る程度の伸縮性が要求され得る。

【0097】

本明細書中で使用される場合、用語「成体の心筋以外の部分」とは、最終分化した心臓中の心筋を除く、任意の部分、組織、細胞、器官を指す。そのような部分、組織、細胞、器官としては、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、幹細胞が挙げられるが、それらに限定されない。これらの細胞は、成体心臓の心筋に由来する細胞に特徴的なマーカーを有さない。このようなマーカー（本明細書において「成体心筋マーカー」という）は、成体心筋に特異的なマーカーであれば、核酸分子（mRNAの発現）、タンパク質、細胞外マトリクス、特定の表現型、細胞の形状などどのようなパラメータでも使用することができ

る。従って、本明細書において具体的に記載されていない成体心筋マーカーであっても、成体心筋由来であることを示すことができるマーカーであれば、どのようなマーカーを利用して、本発明の人工組織を判定してもよい。このような成体の心筋以外の部分の代表例としては、成体の心筋以外の部分が挙げられ、そのような部分としては、例えば、心筋以外の心臓の部分、間葉系幹細胞またはそれに由来する細胞を含む部分、組織、器官、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞）、線維芽細胞、滑膜細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、このような心筋以外の部分に特徴的な特異的マーカーを発現するものを同定することによっても成体の心筋以外の部分であることを確認することができる。

【0098】

本明細書中で使用される場合、用語「成体の心臓以外の部分」とは、最終分化した心臓を除く、任意の組織、細胞、器官を指す。そのような組織、細胞、器官としては、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、幹細胞が挙げられるが、それらに限定されない。これらの細胞は、成体心臓に由来する細胞に特徴的なマーカーを有さない。ここで、成体心臓に特異的なマーカーであれば、核酸分子（mRNAの発現）、タンパク質、細胞外マトリクス、特定の表現型、細胞の形状などどのようなパラメータでも使用することができる。従って、本明細書において具体的に記載されていない心臓心筋マーカーであっても、成体心臓由来であることを示すことができるマーカーであれば、どのようなマーカーを利用して、本発明の人工組織を判定してもよい。このような成体の心臓以外の部分の代表例としては、成体の心臓以外の部分が挙げられ、そのような部分としては、例えば、間葉系幹細胞またはそれに由来する細胞を含む部分、組織、器官、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞）、線維芽細胞、滑膜細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、このような心臓以外の部分に特徴的な特異的マーカーを発現するものを同定することによっても成体の心筋以外の部分であることを確認することができる。

【0099】

本明細書中で使用される場合、「成体の心筋以外の部分」、「成体の心臓以外の部分」はまた、骨格筋芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞、幹細胞などを含む成体の心筋に由来する細胞または成体心臓に由来する細胞に特徴的なマーカー（本明細書においてそれぞれ「非成体心筋マーカー」または「非成体心臓マーカー」という）を一定レベル、例えば、特異的に発現するものの少なくとも約100%未満、好ましくは約80%未満、より好ましくは約50%未満、さらに好ましくは、約25%未満、場合によっては約1%未満発現することによって同定することができる。このようなマーカーとしては、ミオシン重鎖IIA、ミオシン重鎖IIB、ミオシン重鎖IID(IIx)、CD56、MyoD、Myf5、myogeninなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において具体的に記載されていない非成体心臓マーカーであっても、成体心臓以外の由来であることを示すことができるマーカーであれば、どのようなマーカーを利用して、本発明の人工組織を判定してもよい。

【0100】

ここで、ミオシン重鎖IIa（ヒト：アクセッション番号NM_017534；配列番号1および2）、ミオシン重鎖IIb（ヒト：アクセッション番号NM_017533；配列番号3および4）、ミオシン重鎖IId(IIx)（ヒト：アクセッション番号NM_005963；配列番号5および6）とは、であり、筋芽細胞に特異的なマーカーである（HavenithMG, Visser R, Schrijvers-van Schendel JM, Bosman FT. Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies. Histochemistry. 1990;93(5):497-9）。このマーカーは、主にタンパク質の存在を見ることによって確認することができる。ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIbおよびミオシン重鎖IId(IIx)に対する抗体としては、たとえば、Sigmaから入手可能なMY-32などがあり、この抗体は、骨格筋特異的で心筋は染めない（Webster C, Pavlath GK, Parks DR, Walsh FS, Blau HM, Exp Cell Res. 1988Jan;174(1):252-65；およびHavenith MG, Visser R, Schrijvers-van Schendel JM, Bosman FT, 1990;93(5):497-9）。

【0101】

CD56とは、(ヒト:アクセッション番号U63041;配列番号7および8)であり、筋芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは、主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

【0102】

MyoDとは、(ヒト:アクセッション番号X56677;配列番号9および10)であり、筋芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは、主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

【0103】

Myf5とは、(ヒト:アクセッション番号NM_005593;配列番号11および12)であり、筋芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは、主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

【0104】

myogenin (ヒト:アクセッション番号BT007233;配列番号13および14)とは、であり、筋芽細胞に特異的なマーカーである。このマーカーは、主にmRNAの存在を見ることによって確認することができる。

【0105】

他の実施形態では、他の組織に特異的な別のマーカーを利用することができる。そのようなマーカーとしては、例えば、胚性幹細胞についてはOct-3/4、SSEA-1、Rex-1、Otx2などが挙げられ;内皮細胞についてはVE-カドヘリン、Flk-1、Tie-1、PECAM1、vWF、c-kit、CD34、Thy1、Sca-1などが挙げられ;骨格筋について上述のもののほか骨格筋αアクチンなどが挙げられ;神経細胞についてNestin、Gluレセプター、NMDAレセプター、GFAP、ニューレグリン-1などが挙げられ;造血細胞系についてc-kit、CD34、Thy1、Sca-1、GATA-1、GATA-2、FOGなどが挙げられる。

【0106】

本明細書中で使用される場合、用語「由来する」とは、ある種の細胞が、その細胞が元々存在していた細胞塊、組織、器官などから分離、単離、または抽出されたこと、あるいはその細胞を、幹細胞から誘導されたことを意味する。

【0107】

本明細書中で使用される用語「心臓に適用可能な」とは、適用された心臓が拍動するような能力を意味する。このような心臓に適用可能な組織は、拍動する場合の伸縮に耐え得る強度を有することになる。ここでは、心臓への適用可能性は、心筋への適用可能性を含む。

【0108】

本明細書中で使用される場合、用語「三次元構造体」とは、細胞間の電気的結合および配向を保持している細胞を含む、三次元方向に広がる物体を指す。この用語は、任意の形(例えば、シート状など)の物体を包含する。そのようなシート状構造体は、一層でも複数層でもあり得る。

【0109】

本明細書において「細胞シート」とは、単層の細胞から構成される構造体をいう。このような細胞シートは、少なくとも二次元の方向に生物学的結合を有する。生物学的結合を有するシートは、製造された後、単独で扱われる場合でも、細胞相互の結合が実質的に破壊されないことが特徴である。そのような生物学的結合には、細胞外マトリクスを介した細胞間の結合が含まれる。

【0110】

本明細書において「生物学的結合」とは、細胞相互の関係に言及する場合、2つの細胞の間に生物学的になんらかの相互作用があることをいう。そのような相互作用としては、例えば、生体分子(例えば、細胞外マトリクス)を介した相互作用、情報伝達を介した相互作用、電気的相互作用(電気信号の同期などの電気的結合)が挙げられるがそれらに限定されない。相互作用を確認する場合は、その相互作用の特性によって適切なアッセイ方

法を用いる。例えば、生体分子を介した物理的相互作用を確認する場合は、人工組織、三次元構造体などの強度（例えば、引っ張り試験）を確認する。情報伝達を介した場合は、シグナル伝達がなされるかどうかを、遺伝子発現などを介して確認する。あるいは、電気的な相互作用の場合は、人工組織、三次元構造体などにおける電位の状況を測定し、一定の波をもって電位が伝播しているかどうかを見ることによって確認することができる。従って、好ましくは、物理的結合は、スキャフォールドなしで結合しているかどうかを見ることによって判定することができる。本発明において、通常生物学的結合は、少なくとも二次元方向にあれば十分であるが、好ましい実施形態では、三次元すべての方向に生物学的結合を有することが有利であり、そのような場合、三次元構造体を形成し得る。好ましくは、三次元すべての方向にほぼ均等に生物学的結合を有することが有利であることがあるが、別の実施形態では、二次元方向にほぼ均等に生物学的結合を有するが、第三の方向にはすこし弱い生物学的結合を有する人工組織、三次元構造体なども使用され得る。

【0111】

本発明の人工組織、三次元構造体などは、医薬品として提供され得るが、あるいは、動物薬、医薬部外品、水産薬および化粧品等として、公知の調製法により提供され得る。

【0112】

従って、本発明が対象とする動物は、臓器または器官を有するものであれば、どの生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物））でもよい。好ましくは、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）であり、より好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）が用いられる。最も好ましくはヒトが対象とされ得る。移植治療において限界があるからである。

【0113】

本発明が医薬として使用される場合、本発明の医薬は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

【0114】

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明の処置方法において使用される医薬（人工組織、併用される医薬化合物など）の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、組織の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日〜数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回〜1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間〜1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0115】

本明細書中、「投与する」とは、本発明の人工組織、三次元構造体などまたはそれを含む医薬を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与することを意味する。本発明の人工組織は、以下のような治療部位（例えば、障害心臓など）への導入方法、導入形態および導入量が使用され得る。すなわち、本発明の人工組織および三次元構造体の投与方法としては、例えば心筋梗塞、狭心症等で虚血性の障害を受けた心筋組織の障害部位への直接貼付、貼付後に縫合、挿入等の方法があげられる。組み合わせは、例えば、混合物とし

て同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、人工組織などが直接手術によって提供され、他の薬剤は静脈注射によって与えられる場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0116】

本明細書において「補強」とは、意図される生体の部分の機能を改善させることをいう。

【0117】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール）のような形態でも提供され得る。

【0118】

本明細書において「刺激応答性高分子」とは、ある高分子について、ある刺激に対して応答して、その刺激のある前とその刺激を受けた後との形状および／または性質が変化するものをいう。そのような刺激としては、光照射、電場印加、温度変化、pH変化、化学物質の添加などが挙げられるがそれに限定されない。刺激応答性高分子としては、例えば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-メチルメタクリレート）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸ナトリウム）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-ビニルフェロセン）共重合体、 γ 線照射したポリ（ビニルメチルエーテル）（PVME）、ポリ（オキシエチレン）、核酸などの生体物質を高分子に組み込んだ樹脂、および上記高分子に対して架橋剤によって架橋し作製したゲルなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0119】

本明細書において「温度応答性高分子」とは、温度に応答して、その形状および／または性質を変化させる性質を有する高分子をいう。温度応答性高分子としては、例えば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-メチルメタクリレート）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸ナトリウム）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-ビニルフェロセン）共重合体、 γ 線照射したポリ（ビニルメチルエーテル）および上記高分子に対して架橋剤によって架橋し作製したゲルなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、例えば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-メチルメタクリレート）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸ナトリウム）共重合体および上記高分子に対して架橋剤によって架橋し作製したゲルなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される温度応答性高分子としては、例えば、水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が0～80℃であるものが挙げられるがそれらに限定されない。ここで、臨界溶解温度とは、形状および／または性質を変化させる閾値の温度をいう。本明細書では、好ましくは、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）が使用され得る。

【0120】

例えば、 γ 線照射したポリビニルメチルエーテル水溶液は、室温では水和し膨潤してい

るが、温度が上がると脱水和して収縮する感熱性的高分子ゲルとなることが知られている。ゼリーのように均質透明な P V M E ゲルを温めると白濁し透明性が変化する。多孔質構造のゲルを調製したり、繊維または粒子などの小さな形に成形すると高速で伸縮するようになる。このような多孔質構造をもつ繊維状 P V M E ゲルの場合、伸縮速度は 1 秒未満という速さであるといわれる (<http://www.aist.go.jp/NIMC/overview/v27-j.html>、特開 2001-213992 号および特開 2001-131249 号参照)。N-イソプロピルアクリルアミドゲル(すなわち、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド))もまた、温度応答性ゲルとして知られる。ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)に対して、疎水性のモノマーを共重合させると、形状および/または性質が変化する温度を低下させることができ、親水性のモノマーを共重合させると形状および/または性質が変化する温度を上げることができる。これを利用して、所望の刺激に応答した充填剤を調製することができる。このような手法は、他の温度応答性高分子に対しても適用することができる。

【0121】

本明細書において「タンパク質分解酵素」とは、当該分野における通常の意味で用いられ、タンパク質の分解を触媒する酵素をいう。

【0122】

本明細書において「規則的配列」フィルムとは、ある一定の規則によって配列される構造を有するフィルムをいう。このようなフィルムには、ハニカム構造、ライン構造、ドット構造などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の人工組織は、好ましくは、このような規則的配列を用いて生産される。このようなフィルムは、生分解性材料(例えば、ポリ-L-乳酸(PLLA)など)を用いて構成することができる。伸展性のフィルムを作製するためには、ポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL)などを使用することができる。

【0123】

細胞工学、組織工学等において細胞培養を行う場合、細胞の足場となる基材が必要であることが多く、細胞との相互作用において細胞は最良表面の化学的な性質のみならず微細な形状によっても影響を受けることが知られている。細胞の機能制御を目指すとき、細胞と接触する材料表面の化学的性質および細胞の微細な構造の双方の設計が重要となる。ハニカム構造を有する多孔性フィルムではハニカムパターンが細胞接着面を提供し、多孔質構造が細胞の支持基盤へのアクセス、栄養の供給ルートとなることが示されている。従って、本発明において、このようなハニカム構造を利用することが好ましい。

【0124】

このハニカム構造フィルムをベースに細胞を組織化すれば、その 1 つの利用方法として人工臓器または人工組織が提供される。人工臓器または人工組織等にしたときには体内に吸収される可能性があることから、この基材は長期的には生体内へ吸収されることが望ましい。これまでのハニカム構造を与える材料で細胞培養に要する時間は安定に構造を維持し、それ以上では分解するような生分解性材料から作られたものは、例えば、特開 2001-157574 号、特開 2002-335949 号などに記載されている。

特開 2001-157574 号には、生分解性ポリマーが 50~99 w/w% および両親媒性ポリマーが 50~1 w/w% からなるポリマーの疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度 50~95% の大気下で基板上にキャストし、この有機溶媒を徐々に蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることで得られるハニカム構造体、並びに該ハニカム構造体からなるフィルムが開示されている。また、特開 2002-335949 号には、この方法で作製したハニカム構造を有するフィルムを用いて、生体組織に類似した秩序だった細胞の三次元集合体の形成することができることが記載されている。

【0125】

本発明において用いられるフィルムは、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーまたは生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとを含むポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時にこのキャスト液表面で結露さ

せ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られる。

【0126】

本発明では、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーを使用してもよいし、あるいは、生分解性を有するポリマーと両親媒性を有するポリマーから成る複数のポリマーの混合物を使用してもよい。

【0127】

本発明で用いることができる生分解性ポリマーとしては、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペートなどの生分解性脂肪族ポリエステル、並びにポリブチレンカーボネート、ポリエチレンカーボネート等の脂肪族ポリカーボネート等が、有機溶媒への溶解性の観点から好ましい。中でも、ポリ乳酸、ポリカプロラクトンが入手の容易さ、価格等の観点から望ましい。

【0128】

本発明で用いることができる両親媒性ポリマーとしては、細胞培養基材として利用することを考慮すると毒性のないことが好ましく、ポリエチレングリコール／ポリプロピレングリコールブロック共重合体、アクリルアミドポリマーを主鎖骨格とし、疎水性側鎖としてドデシル基と親水性側鎖としてラクトース基或いはカルボキシル基を併せ持つ両親媒性ポリマー、或いはヘパリンやデキストラン硫酸、核酸（DNA、RNAなど）などのアニオン性高分子と長鎖アルキルアンモニウム塩とのイオンコンプレックス、ゼラチン、コラーゲン、アルブミン等の水溶性タンパク質を親水性基とした両親媒性ポリマー等を利用することが望ましい。生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸－ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリε－カプロラクトン－ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリリンゴ酸－ポリリンゴ酸アルキルエステルブロック共重合体などが挙げられる。

【0129】

本明細書中で使用される場合、用語「障害心臓」および「障害心筋層」とは、障害（例えば、虚血性障害が挙げられるが、これに限定されない）を受けた心臓および心筋層を指す。そのような虚血性障害としては、心筋梗塞、狭心症等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

本明細書において「三次元化促進因子」とは、細胞シートを構成した後、そのようなシートが三次元方向に生物学的結合することを促進させる因子をいう。そのような因子としては、代表的には、細胞マトリクスの分泌を促進するような因子が挙げられる。そのような三次元化促進因子としては、例えば、アスコルビン酸またはその誘導体（例えば、アスコルビン酸2リン酸、アスコルビン酸1リン酸、L-アスコルビン酸ナトリウムなど）ならびにその塩などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、このような三次元化促進因子は、適用が意図される部分の細胞外マトリクスの組成成分および／またはその量に類似するように細胞外マトリクスの分泌を促す成分（単数または複数）であることが好ましい。そのような三次元化促進因子が複数の成分を含む場合は、そのような複数成分は、適用が意図される部分の細胞外マトリクスの組成成分および／またはその量に類似するように組成され得る。

【0131】

本明細書において「アスコルビン酸またはその誘導体」には、アスコルビン酸およびその類似体（例えば、アスコルビン酸2リン酸、アスコルビン酸1リン酸など）、およびその塩（例えば、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩など）が含まれる。アスコルビン酸は、L体であることが好ましいがそれに限定されない。

【0132】

（発明を実施するための最良の形態）

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内

で適宜改変を行うことができることは明らかである。

【0133】

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

【0134】

1つの局面において、本発明は、成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む、心臓に適用可能な三次元構造体を提供する。心臓に適用可能な三次元構造体は、従来成体の心筋由来の細胞で小型で性能の悪いものが提供されていた。本発明は、特定の培養条件下（例えば、三次元化促進因子の存在など）で成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む細胞を培養することにより、世界で初めて心臓に適用可能な三次元構造体を提供することができたという効果を有する。このような三次元構造体は、細胞を含み、好ましくは実質的に細胞および細胞に由来する成分（例えば、細胞外マトリクスなど）から構成される。このように、本発明の三次元構造体は、好ましい実施形態において生体物質から構成されることから、従来の足場（scaffold）を用いた構造体に比べて、足場に起因する欠点（例えば、生体適合性の問題、免疫原性の問題など）が解消されるという点で有利である。

。

【0135】

1つの好ましい実施形態において、本発明の三次元構造体が含む細胞は、幹細胞であっても分化細胞であっても両方を含んでもよい。好ましい実施形態では、本発明の三次元構造体が含む細胞は、間葉系細胞である。理論に束縛されないが、間葉系細胞が好ましいのは、間葉系細胞自体が心臓など種々の臓器と適合性が優れているからであり、心臓などの多種類の臓器へ分化する能力を有し得るからである。

【0136】

そのような間葉系細胞は、間葉系幹細胞であっても間葉系の分化細胞であってもよい。

【0137】

本発明において使用される間葉系細胞としては、例えば、骨髄、脂肪細胞、滑膜細胞、などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される間葉系幹細胞としては、例えば、脂肪組織由来の幹細胞、骨髄由来の幹細胞などを用いることができる。

【0138】

より好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞は、筋芽細胞に由来することが好ましい。筋芽細胞を用いた三次元構造体が心臓において適用可能であることは、従来予測不可能であったことであり、驚くべき効果であるといえる。筋芽細胞が好ましい理由としては、例えば、供給源が豊富であることが挙げられるがそれに限定されない。

【0139】

さらに好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞は、骨格筋芽細胞である。骨格筋芽細胞は、豊富に存在することから容易に入手可能な供給源として好ましい。また、骨格筋芽細胞は、本発明において初めて実証されるように、心臓に対する移植可能性が示されたことから、実際の医療に使用可能である。

【0140】

このように、自己の心筋以外の部分に由来する細胞をうまく培養することによって心臓移植手術を行わなくても、欠陥心臓を修復することができる。

【0141】

別の実施形態において、本発明において使用される細胞は、線維芽細胞であってもよい。線維芽細胞もまた、三次元構造体において三次元方向に生物学的結合を有することが確認されたからである。ただし、線維芽細胞を用いた三次元構造体は、心臓への適用の他、他の用途（例えば、整形外科用）にも用いることができる。

【0142】

別の実施形態において、本発明において使用される細胞は、滑膜細胞であってもよい。

滑膜細胞もまた、三次元構造体において、顕著に三次元方向の生物学的結合を有する。従って、このような滑膜細胞から構成される三次元構造体もまた、心臓用途に使用することができる。あるいは、このような滑膜細胞から構成される三次元構造体は、心臓用途以外にも補強に使用することができ、そのような用途としては、例えば、骨、軟骨、関節、筋肉などの補強が挙げられるがそれらに限定されない。

【0143】

別の実施形態において、本発明において使用される細胞は、幹細胞に由来する。幹細胞に由来する細胞から構成される三次元構造体は、所望の方向に分化させた細胞を利用することができるからである。従って、心臓に用いる場合は、心臓の分化細胞への分化の方向に分化させた幹細胞を用いることが好ましくあり得る。そのような分化の手法としては、LIFを用いて分化させることなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0144】

好ましい実施形態において、本発明において使用される細胞は、三次元構造体が適用される被験体に由来する細胞であることが有利である。このような場合、本明細書において使用される細胞は自己細胞ともいわれるが、自己細胞を用いることによって、免疫拒絶反応を防ぐかまたは低減することができる。

【0145】

あるいは、別の実施形態では、本発明において使用される細胞は、三次元構造体が適用される被験体に由来しない細胞であってもよい。この場合、好ましくは、免疫拒絶反応を防ぐ手段が講じられることが好ましい。

【0146】

別の実施形態において、本発明の三次元構造体は、その中に含まれる細胞がミオシン重鎖IIA、ミオシン重鎖IIB、ミオシン重鎖IID(IIX)、CD56、MyoD、Myf5、myogeninおよびMRF4からなる群より選択される少なくとも1つの非成体心臓マーカーを発現する。このような非成体心臓マーカーを有することによって、非成体心臓由来の細胞を用いた三次元構造体であることが確認され得る。本発明の三次元構造体は、成体の心臓を使用することを回避することによって、心臓治療の可能性を格段に増加させたという効果をもたらす。

【0147】

このような非成体心臓マーカーは、その非成体心臓の臓器または組織が通常有するレベルの量で発現されており、通常例えば、非成体心臓の臓器または組織が天然で有するレベルの少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約100%以上のレベルで存在し得る。このようなレベルを確認する方法としては、例えば、PCR、ノーザンブロットリングなどのmRNA発現量を確認するブロットリング、あるいはウェスタンブロットリングなどの発現タンパク質の量を確認するブロットリングなどが挙げられる。PCRを利用する場合、上述の非成体心臓マーカーのうち、特異的なプライマーを当該分野において周知の方法によって（例えば、市販のPCRプライマー設計装置を利用する）設計し、対象となる組織または細胞からmRNAを含む試料を抽出しcDNAを当該分野において周知の手法によって調製し、これを用いて特異的発現の検出を可能にするPCRサイクルを行い、その後増幅された産物を例えば電気泳動およびその後の染色によって確認することによって発現レベルを測定することができる。ノーザンブロットリングの場合は、上述の非成体心臓マーカーの核酸配列全部または一部（特に、特異的検出を可能にするもの）をプローブとして調製し、対象となる組織または細胞からmRNAを含む試料を抽出し電気泳動によって分離した後、上述のプローブを用いて発現を検出することができる。マーカーがタンパク質発現を伴う場合は、それに対する特異的抗体を調製し、その抗体を用いてウェスタンブロットリングなどの抗原抗体反応を用いることによって発現を検出することができる。

【0148】

別の実施形態において、本発明の三次元構造体は、その中に含まれる細胞がGATA-

4、Cx s/Nk x 2. 5およびMEF 2からなる群より選択される少なくとも1つの成体心臓マーカーを実質的に含まない。このような成体心臓マーカーを実質的に有しないことによって、非成体心臓由来の細胞を用いた三次元構造体であることが確認され得る。本発明の三次元構造体は、成体の心臓を使用することを回避することによって、心臓治療の可能性を格段に増加させたという効果をもたらす。

【0149】

このような成体心臓マーカーは、成体心臓の臓器または組織が通常有するレベルの量未満で発現されており、通常例えば、成体心臓の臓器または組織が天然で有するレベルの少なくとも約100%未満、好ましくは少なくとも約80%未満、より好ましくは少なくとも約50%未満、より好ましくは少なくとも約20%未満、より好ましくは少なくとも約10%未満、より好ましくは少なくとも約5%未満のレベルで存在する。

【0150】

好ましい実施形態では、本発明の三次元構造体は、中に含まれる細胞がすべての成体心臓マーカーを実質的に含まない。成体心臓マーカーすべてを確認することによって、成体心臓以外であることを確認することがより確実にできるからである。ただし、これらすべてを常に確認する必要があるというわけではない。

【0151】

好ましくは、本発明の三次元構造体において使用される細胞は、心臓以外の細胞であることが好ましい。心筋以外の細胞であれば、本発明において利用可能であるが、心臓由来の細胞は、その供給源が限定されていること、および自己由来の心臓由来の細胞は実質的に入手不可能であることから、心臓以外に由来する細胞を用いることが好ましい。

【0152】

本発明の三次元構造体の適用可能性は、通常心臓であるが、それ以外の臓器へ適用されてもよい。好ましくは、本発明の三次元構造体は、心筋へ適用され得る。

【0153】

1つの実施形態において、本発明の三次元構造体は、少なくとも単層の細胞シートを含み、ある実施形態では、本発明の三次元構造体は、単層の細胞シートによって構成される。細胞シートが含まれることによって、本発明の三次元構造体は、無傷であることが保証され、あるいは、無孔性が保証されるからである。従って、細胞シートを少なくとも単層で持つ本発明の三次元構造体は、損傷部位を覆う用途において有用である。

【0154】

好ましい実施形態において、本発明の三次元構造体は、複数の層の細胞シートを含む。好ましくは、この複数の層の細胞シートは、互いに生物学的に結合していることが有利である。生物学的に結合とは、この場合、細胞外マトリクスを介した物理的結合、あるいは、拍動などの電気的結合であることが好ましいが、それらの結合は、所望とされる部位に応じて変動する。心臓への移植が意図される場合、このような生物学的結合は、通常電気的結合を含む。あるいは、このような生物学的結合は、スキャフォールドなしでの結合という側面で記載することができる。

【0155】

本発明の三次元構造体は、医薬として提供されていてもよい。あるいは、本発明の三次元構造体は、医師などが医療現場で調製してもよく、または、医師が細胞を調製した後、その細胞を第三者が培養して三次元構造体として調製し、手術に用いてもよい。この場合、細胞の培養は、医師でなくても、細胞培養の当業者であれば実施することができる。従って、当業者であれば、本明細書における開示を読めば、細胞の種類および目的とする移植部位に応じて、培養条件を決定することができる。

【0156】

別の局面において、本発明は、成体の心臓以外の部分に由来する細胞を含む、心臓に適用可能な三次元構造体を製造する方法を提供する。この方法は、a) 温度応答性高分子を含む支持体上で成体の心筋以外の部分に由来する細胞を培養する工程；b) 培養温度をその温度応答性高分子の臨界溶解温度の外側にする工程（この場合、上限がある場合、上限

以上であり、下限がある場合下限以下) ; および c) 培養した細胞を三次元構造体として剥離する工程を含む。ここで、心筋以外の部分に由来する細胞は、心臓以外の部分に由来する細胞であり、例えば、間葉系の細胞 (例えば、筋芽細胞、骨格筋芽細胞、滑膜細胞、線維芽細胞) などであり得る。好ましくは、臨界溶解温度の外側とは、水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が 0 ~ 80℃ である。温度応答性高分子を含む支持体は、好ましくは、そのような温度応答性高分子がグラフティングされている。

【0157】

好ましい実施形態では、本発明の三次元構造体製造法において剥離またはその前に、タンパク質分解酵素による処理がなされないことが好ましい。従来の細胞シートなどの調製方法では、タンパク質分解酵素による処理を行うことによって剥離を容易にしていたが、これにより細胞シートが損傷を受け、三次元構造体とはなっていなかったという問題があった。本発明は、上記のような方法を用いることによって、タンパク質分解酵素による処理を省くことができ、その結果、損傷のない三次元構造体が提供されたという効果をもたらす。

【0158】

好ましい実施形態では、温度応答性高分子は、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) である。ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) は、20℃ 強という下限臨界溶解温度を有することから、この場合、通常の培養温度 (例えば、37℃ 前後) から培養液を 20℃ 前後にすることによって、容易に三次元構造体を調製することができるという効果もたらされる。これによって、移植手術に適用可能な、成体心筋以外に由来する細胞から構成される三次元構造体が提供された。これにより、従来心臓移植しか助かる道の無かった数多くの疾患 (例えば、拡張型心筋症など) にとって、実質的に臓器移植以外の手法が提供されるという従来の方法では不可能であった治療法を提供する。

【0159】

別の局面において、本発明が提供する人工組織および三次元構造体は、培養時にデisperse、トリプシン等で代表されるタンパク質分解酵素による損傷を受けていないものである。そのため、基材から剥離された人工組織および三次元構造体は、細胞、細胞間のタンパク質 (例えば、細胞外マトリクス) が保持された強度ある細胞塊として回収することができ、心筋細胞特有の収縮弛緩機能、細胞間の電氣的結合、および配向性等の機能を何ら損なうことなく保有している。また、三次元構造体においては、例えば、結合組織からなる膜形成、血管内皮細胞による管腔形成等の生体組織様の幾つかの特徴ある細胞の配列も認められる。トリプシン等の通常のタンパク質分解酵素を使用した場合、細胞、細胞間のデスモソーム構造、および細胞、基材間の基底膜様タンパク質等は殆ど保持されておらず、従って細胞は個々に5分かれた状態となって剥離される。その中でタンパク質分解酵素であるデisperseに関しては、細胞、基材間の基底膜様タンパク質を殆ど破壊してしまふものの、デスモソーム構造については10℃ ~ 60℃ に保持した状態で剥離させることができることで知られているが、得られる三次元構造体および人工組織は強度の弱いものである。それに対し、本発明の三次元構造体および人工組織は、デスモソーム構造、基底膜様タンパク質が共に80%以上残存された状態のものであり、その結果上述したような種々の効果を得ることができるようになる。細胞培養支持体において基材の被覆に用いられる温度応答性ポリマーは、水溶液中で上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度0℃ ~ 80℃、より好ましくは20℃ ~ 50℃ を有する。上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が80℃ を越えると細胞が死滅する可能性があるのが好ましくない。また、上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が0℃ より低いと一般に細胞増殖速度が極度に低下するか、または細胞が死滅してしまうため、やはり好ましくない。

【0160】

本発明に用いる温度応答性重合体はホモポリマー、コポリマーのいずれであってもよい。このような重合体としては、上述のほかに、例えば、特開平2-211865号公報に記載されている重合体が挙げられる。具体的には、例えば、以下のモノマーの単独重合または共重合によって得られる。使用し得るモノマーとしては、例えば、(メタ) アクリルア

ミド化合物、N-（若しくはN，N-ジ）アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体、またはビニルエーテル誘導体が挙げられ、コ重合体の場合は、これらのうちの任意の2種以上を使用することができる。更には、上記モノマー以外のモノマー類との共重合、重合体同士のグラフトまたは共重合、あるいはホモポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、重合体本来の性質を損なわない範囲で架橋することも可能である。被覆を施される基材としては、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物を初めとして、一般に形態付与が可能である物質、例えば、上記以外の高分子化合物、セラミックス類など全て用いることができる。

【0161】

温度応答性重合体の支持体への被覆方法は、特に制限されないが、例えば、特開平2-211865号公報に記載されている方法に従ってよい。すなわち、被覆は、基材と上記モノマーまたは重合体を、電子線照射（EB）、 γ 線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、有機重合反応のいずれかにより、または塗布、混練等の物理的吸着等により行うことができる。

【0162】

本発明において、細胞の培養は上述のようにして製造された細胞培養支持体上（例えば、細胞培養皿）で行われる。培地温度は、基材表面に被覆された前記重合体が上限臨界溶解温度を有する場合はその温度以下、また前記重合体が下限臨界溶解温度を有する場合はその温度以上であれば特に制限されない。しかし、培養細胞が増殖しないような低温域、あるいは培養細胞が死滅するような高温域における培養が不適切であることは言うまでもない。温度以外の培養条件は、当該分野において周知の技術を用いることができ、特に制限されるものではない。例えば、使用する培地については、公知のウシ胎仔血清（FCS）等の血清が添加されている培地でもよく、また、このような血清が添加されていない無血清培地でもよい。

【0163】

本発明の方法においては、上記方法に従い、人工組織または三次元構造体の使用目的に合わせて培養時間を設定すればよい。培養した人工組織または三次元構造体を支持体材料から剥離回収するには、培養された人工組織もしくは三次元構造体をそのまま、またはは必要に応じ高分子膜に密着させ、細胞の付着した支持体材料の温度を支持体基材の被覆重合体の上限臨界溶解温度以上若しくは下限臨界溶解温度以下にすることによって、培養された細胞シートまたは三次元構造体を単独で、若しくは高分子膜に密着させた場合はそのまま高分子膜とともに剥離することができる。なお、人工組織または三次元構造体を剥離することは細胞を培養していた培養液において行うことも、その他の等張液において行うことも可能であり、目的に合わせて選択することができる。また、必要に応じ細胞シートまたは三次元構造体を密着させる際に使用する高分子膜としては、例えば、親水化処理が施されたポリビニリデンジフルオライド（PVDF）、ポリプロピレン、ポリエチレン、セルロースおよびその誘導体、キチン、キトサン、コラーゲン、和紙等の紙類、ウレタン、スパンデックス等のネット状・スリキネット状高分子材料を挙げることができる。ここで、ネット状、ストックネット状高分子材料であれば人工組織および三次元構造体は自由度が増し、収縮弛緩機能を更に増大させることができる。本発明における細胞の人工組織および三次元構造体の製法は特に限定されるものではないが、例えば、上記した高分子膜に密着した培養細胞シートを利用することで製造することができる。

【0164】

本発明の人工組織および三次元構造体を高収率で剥離、回収する目的で、細胞培養支持体を軽くたたいたり、ゆらしたりする方法、さらにはピペットを用いて培地を攪拌する方法等を単独で、あるいは併用して用いてもよい。加えて、必要に応じて人工組織および三次元構造体は、等張液等で洗浄して剥離回収してもよい。基材から剥離された人工組織、または三次元構造体は、特定方向に引き伸ばすことで、さらに配向された細胞シートまたは三次元構造体となる。その引き伸ばす方法は、何ら制約されるものではないが、テンションなどの引っ張り装置を用いる方法、あるいは、単純にピンセットで引っ張る方法等が

挙げられる。配向させることで、細胞シートおよび三次元構造体自身の動きに方向性を持たせることができ、このことは、例えば、特定の臓器の動きに合わせて、人工組織あるいは三次元構造体を重ね合わせることを可能とするため、人工組織あるいは三次元構造体を臓器に適用する場合に効率が良い。

【0165】

上述の方法により得られた人工組織および三次元構造体は、従来の方法では得られなかったものである。得られた人工組織あるいは三次元構造体は従来技術では断絶された基底膜を保持している為、心臓、骨、筋肉、腕、肩、足、その他のいかなる臓器等、生体内のどこに埋入しても、周囲の組織に良く生着し、それぞれの場合で脈を打ち続ける。理論に束縛されないが、これは、生体内に埋入された人工組織あるいは三次元構造体が、生体組織に生着すると同時に、収縮弛緩することで低酸素状態となり、それを補うために生体組織側より積極的に血管内皮細胞が進入し、血管が形成され、血液を介して酸素のみならず栄養分も十分に補給された結果と考えられる。以上より、生体内に埋入された人工組織および三次元構造体により、生体内で機能性組織が形成されることとなる。それらは移植用等の臨床応用が強く期待される。具体的には、本発明の人工組織、三次元構造体あるいは組織を心臓の収縮力の弱まった部位に移植することで、心筋梗塞等の心疾患等に対する治療用器具として、あるいはそれらを血管の周囲に当てることで血行を改善させることができ、例えば、重度のレイノウ、重度な肩こり、さらには大動脈の機能不全等の治療用器具として有用なものとなる。なお、本発明の方法において使用される細胞培養支持体は繰り返し使用が可能である。

【0166】

(三次元化促進因子による人工組織の調製)

別の局面において、本発明は、人工組織を生産するための方法を提供する。この人工組織生産法は、A) 細胞を提供する工程；B) 該細胞を、三次元化促進因子を含む細胞培養液を収容する、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する容器に配置する工程；およびC) 該容器中の該細胞を、該所望の大きさのサイズを有する人工組織を形成するに十分な時間培養する工程、を包含する。

【0167】

ここで用いられる細胞は、どのような細胞であってもよい。細胞を提供する方法は、当該分野において周知であり、例えば、組織を摘出してその組織から細胞を分離する方法、あるいは、血液細胞などを含む体液から細胞を分離する方法、あるいは、細胞株を人工培養によって調製する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される細胞は任意の幹細胞または分化細胞であり得るが、特に、筋芽細胞、間葉系幹細胞、脂肪細胞、滑膜細胞、骨髄細胞などを用いることができる。本明細書において使用される間葉系幹細胞としては、例えば、脂肪組織由来の幹細胞、骨髄由来の幹細胞などを用いることができる。

【0168】

本発明の人工組織生産法では、三次元化促進因子を含む細胞培養液が使用される。このような三次元化促進因子としては、例えば、アスコルビン酸またはその誘導体などが挙げられ、例えば、アスコルビン酸1リン酸、アスコルビン酸2リン酸、L-アスコルビン酸などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0169】

本発明において使用される細胞培養液は、目的とする細胞が増殖する限りどのような培地であってもよいが、例えば、DMEM、MEM、F12、DME、RPMI1640、MCDB104、199、MCDB153、L15、SkBM、Basal培地などを適宜グルコース、FBS（ウシ胎仔血清）、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシンなど）を加えてたものが使用され得る。

【0170】

本発明の方法において使用される容器は、所望の人工組織のサイズを収容するに十分な底面積を有する限り、当該分野において通常使用されるような容器を用いることができ、

例えば、シャーレ、フラスコ、型容器など、好ましくは底面積が広い（例えば、 1 cm^2 以上）容器が使用され得る。その容器の材質もまた、どのような材料を利用してもよく、ガラス、プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリカーボネートなど）、シリコンなどが用いられ得るがそれらに限定されない。

【0171】

好ましい実施形態では、本発明の人工組織生産法に用いられる三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸を含む。従来アスコルビン酸を細胞培養に用いることは知られていたが、アスコルビン酸 2 リン酸を意図的に加えて組織形成を行ったという報告はなされていない。本発明では、アスコルビン酸 2 リン酸を一定量加えることによって、生産される細胞外マトリクスが多すぎず、その組成も移植可能にする程度となり、従って、細胞と細胞外マトリクスとの比率が移植可能な程度の強度などを保持させることを達成したという予想外の効果が奏される。

【0172】

好ましい実施形態では、本発明において使用されるアスコルビン酸 2 リン酸は、通常少なくとも 0.01 mM で存在し、好ましくは少なくとも 0.05 mM で存在し、さらに好ましくは少なくとも 0.1 mM で存在する。より好ましくは少なくとも 0.2 mM の濃度で存在することが好ましい。さらに好ましくは、 0.5 mM の濃度、さらにより好ましくは 1.0 mM の濃度で存在することが好ましい。

【0173】

あるいは、本発明において使用されるアスコルビン酸 2 リン酸は、アスコルビン 1 リン酸と共存して用いられる。この場合、使用されるアスコルビン酸 1 リン酸とアスコルビン酸 2 リン酸とは、特定の比率で用いることが好ましくあり得る。そのような好ましい比率としては、例えば、 $1:10 \sim 10:1$ の範囲内が挙げられる。あるいは、好ましい比率としては、アスコルビン酸 1 リン酸のモル量がアスコルビン酸 2 リン酸よりも少ないという関係を挙げることができる。

【0174】

別の実施形態において、本発明において使用される三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸を含む。アスコルビン酸 2 リン酸を明示的に加えて組織形成を行ったという報告はなされていない。本発明では、アスコルビン酸 2 リン酸を一定量加えることによって、生産される細胞外マトリクスが多すぎず、その組成も移植可能にする程度となり、従って、細胞と細胞外マトリクスとの比率が移植可能な程度の強度などを保持させることを達成したという予想外の効果が奏される。

【0175】

好ましい実施形態では、アスコルビン酸 1 リン酸のモル量がアスコルビン酸 2 リン酸よりも少ない場合、本発明において使用されるアスコルビン酸 2 リン酸は、通常少なくとも 0.01 mM で存在し、好ましくは少なくとも 0.05 mM で存在し、さらに好ましくは少なくとも 0.1 mM で存在する。より好ましくは少なくとも 0.2 mM の濃度で、さらに好ましくは少なくとも 0.5 mM の濃度で存在することが好ましい。さらにより好ましくは 1.0 mM の濃度で存在することが好ましい。

【0176】

ある好ましい実施形態では、本発明において使用される三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビンまたはその塩を含む。

【0177】

本発明の人工組織生産法において使用される容器は、温度応答性高分子でコーティングされることが好ましい。あるいは、別の好ましい実施形態では、この容器は、ハニカム構造をした足場が敷かれていることが好ましいがそれに限定されない。ハニカム構造の利用については、例えば、田中賢ら、「新しいバイオメディカルインターフェイス」化学工業 2002 年 12 月号 901-906、化学工業社に記載されており、これを参照することができる。

【0178】

本発明の人工組織生産法において使用され得る温度応答性高分子は、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を含む。

【0179】

好ましい実施形態では、本発明の人工組織生産法では、培養した工程に続き、D) 人工組織を剥離させ自己収縮させる工程、をさらに含む。剥離は、物理的な刺激（例えば、容器の角に棒などで物理的刺激を与えるなど）を行うことによって促進することができる。温度応答性高分子を用いる場合、その臨界溶解温度よりも高いまたは低い温度に環境を操作することによって、剥離を促進することができる。自己収縮は、このような剥離の後自然に起こる。自己収縮により、特に第三次元方向（シート上の組織に関する場合、二次元方向と鉛直な方向）の生物学的結合が促進される。このようにして製造されることから、本発明の人工組織は、三次元構造体という形態をとるといえる。

【0180】

本発明の人工組織生産法では、十分な時間とは、目的とする人工組織の用途によって変動するが、好ましくは少なくとも3日間を意味するが、それ以上であってもよく、それ以下であってもよい。例示的な期間としては、3～7日間を上げることができる。3日間培養することによって、少なくとも心臓などの臓器の補強に使用することができる程度の移植片を調製することができるからである。

【0181】

別の実施形態において、本発明の人工組織生産法は、人工組織を分化させる工程、をさらに含む。分化させることによって、所望の組織により近い形態を採らせることができるからである。そのような分化としては、例えば、骨分化を挙げることができるがそれらに限定されない。好ましい実施形態では、骨分化は、デキサメタゾン、 β グリセロホスフェートおよびアスコルビン酸2リン酸を含む培地中で行われ得る。

【0182】

本発明の人工組織作製法に含まれる分化工程は、前記細胞の提供の前または後に行われ得る。

【0183】

本発明において使用される細胞は、初代培養のものを使用することができるが、それに限定されず、継代した細胞を用いることもできる。好ましくは、継代した細胞を用いる場合、細胞は、4継代以上の細胞を用いることが好ましく、より好ましくは、5継代以上の細胞を用い、さらに好ましくは、6継代以上の細胞を用いることが有利である。細胞密度の上限が、継代数を上げるに従って上がっていくことから、より密な人工組織を作製することができると考えられるからである。

【0184】

1つの実施形態において、本発明では、細胞は、 $7.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の以下の細胞密度で提供される。この場合、細胞は、6継代以上の細胞を用いることが好ましい。これより高い密度で播種した場合、自己支持性を保持する可能性が低くなるからである。

【0185】

別の実施形態において、本発明では、細胞は、 $5.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される。この場合、細胞は、5継代以上の細胞を用いることが好ましい。これより高い密度で播種した場合、自己支持性を保持する可能性が低くなるからである。

【0186】

他の実施形態において、本発明では、細胞は、 $4.0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 以下の細胞密度で提供される。これより高い密度で播種した場合、この場合、細胞は、4継代以上の細胞を用いることが好ましい。これより高い密度で播種した場合、自己支持性を保持する可能性が低くなるからである。

【0187】

本発明では、細胞は、好ましくは、 $5.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 以上の細胞密度で提供されるがそれに限定されない。細胞密度を十分上げることによって、より強度の高い人工組織

を提供することができるからである。ただし、下限は、これよりも低くあり得ることが理解される。当業者は、本明細書の記載に基づき、そのような下限を規定することができることが理解される。

【0188】

1つの実施形態において、本発明において使用され得る細胞としては、例えば、筋芽細胞、滑膜細胞、脂肪細胞、間葉系幹細胞（例えば、脂肪組織または骨髄由来）を用いることができるが、それらに限定されない。このような細胞は、例えば、心臓、骨、軟骨、腱、靱帯、関節、半月などに適用可能である。

【0189】

別の局面において、本発明は、機能的人工組織を提供する。本明細書では、本発明の機能的人工組織は、移植可能な人工組織である。これまでも細胞培養によって人工組織を作製することが試みられているが、いずれも、大きさ、強度、はがすときの物理的損傷などによって移植に適した人工組織とはなっていなかった。本発明は、上述のような三次元化促進因子の存在下で細胞を培養することによって、大きさ、強度などの点で問題が無く、剥離させるときに特に困難を伴わない組織培養方法が提供された。このような組織培養法が提供されたことによって、初めて移植可能な人工組織が提供されたことになる。従来、臓器移植のみに頼っていた疾患（例えば、難治性心疾患（心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症など））にとっては、それ以外の汎用性のある治療法が提供されることになり、その有用性は計り知れない。

【0190】

本発明が対象とする「疾患」は、組織に傷害がある任意の心疾患であり得る。そのような心疾患としては、心不全、心筋梗塞、心筋症などが挙げられる。本発明の併用療法は、組織傷害の再生を目的とする限り、心臓以外の臓器の傷害を再生するためにも適用され得る。特定の実施形態において、本発明の方法が対象とする疾患は、難治性心不全である。

【0191】

本明細書において「心不全」とは、心機能不全、循環機能不全、収縮力減退など心臓自体に障害があつて、全身の臓器へ必要な量および質の血液を循環し得なくなった状態をいう。心不全は、心筋梗塞、心筋症などの心臓疾患の末期の症状である。重症心不全とは、その程度が重症であるものをいい、末期心不全ともいう。

【0192】

本明細書において「難治性心不全」とは、内科的治療、薬物治療では改善が困難な治療抵抗性心不全をいい、慢性心不全または末期的心不全とはほぼ同義に用いられる。このような難治性心不全は、通常ジギタリス薬、利尿薬、ACE阻害薬などを用いるトリプルセラピー、 β 遮断薬を加えた薬物治療ではコントロールできない。これらの治療には、IABP (intra-aortic balloon pumping) またはPCPS (percutaneous cardiopulmonary support) などによる機械的循環補助、あるいは心臓移植を必要とすることから、簡便でかつ根本的な治療の開発が求められていた。特に、心臓移植は、ドナー不足が深刻であり、心臓移植適応除外症例（たとえば、高齢者、透析症例など）の場合は難治性心不全は大きな問題となっており、心臓移植代替治療が切望されている。

【0193】

本明細書において「心筋梗塞」とは、冠状動脈の種々の病変による高度狭窄、閉塞によってその灌流領域に虚血性壊死が生じる疾患である。心筋梗塞の重傷度判定には、種々の分類がある。そのような分類としては、例えば、時間的経過による分類、形態学的分類（心筋層内範囲、部位、壊死の大きさなど）、心筋の壊死形態、梗塞後の心室再構築、血行動態的（治療、予後などに関連する）、臨床的重症度による分類などが挙げられる。ここで重症度が高いものを特に重症心筋梗塞という。

【0194】

本明細書において「心筋症」とは、心筋の器質的および機能的な異常に起因する疾患の総称であり、高血圧、代謝異常症、虚血などの基礎疾患に続発する二次性心筋症、および

見かけ上の基礎疾患なしに発症する突発性心筋症に分類される。病理的变化としては、心筋肥大、線維化、変性などが認められる。

【0195】

本明細書において「拡張型心筋症」とは、左室の拡張を伴った左心室の機能不全をいい、「うっ血性心筋症」とも言われる。本明細書において「DCM」(dilated cardiomyopathy)と略することがある。拡張型心筋症では、収縮不全が伴い、慢性心不全をきたす。病因としては、たとえば、ウイルス感染、遺伝子変異など多様なものが挙げられる。一般的には、他に明らかな一義的原因のある虚血性心筋症、代謝異常などに伴う心筋疾患などの特定心筋疾患(従来、二次性心筋疾患と称されていた疾患)は含まれないとされるが、本発明の目的では、その治療効果が示される限り、本発明の範囲内に入る。大部分の患者は全体に収縮力低下を示すが孤立性に部分的壁運動異常が起こることもあるといわれる。通常はうっ血を伴う心不全徴候を示すが、低心拍出量状態を現す倦怠感を示すこともある。拡張型心筋症は、原因不明で、特発性の心筋疾患である。主な病態は心筋収縮力の低下であり、その結果左室内腔の拡大をきたす。左室拍出血液量の減少、左室拡張期圧の上昇などを起こす。発症は急性または潜行性であり、末期では難治性心不全を呈することが多い。病理組織学的には、びまん性にあるいは局所的に心筋組織の変性、線維化、萎縮が認められる。残存心筋細胞が肥大している例も多い。心不全のほか重篤な不整脈、血栓塞栓症をきたし、予後はきわめて不良である。診断上とくに有用なものは心エコー図であり、びまん性壁運動の低下、心室壁の菲薄化、心室内腔の拡大を証明する。これに冠動脈造影術にて冠動脈病変の否定、心筋生検(心筋バイオプシー)を行うことによりより確実に診断することができる。従って、本発明では、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査、核医学検査(心筋シンチ検査)、心筋生検など当該分野において周知の検査手法を行うことによって拡張型心筋症の改善を確認することができる。

【0196】

従来、拡張型心筋症では、ACE阻害薬、利尿薬、 β 遮断薬、強心薬などによる薬物療法、塩分・水分摂取制限、運動制限などの生活指導が行われているが、いずれも疾患そのもののに対する治療ではない。不整脈に対してはアミオダロンなどの抗不整脈投与が行われているが、これも対症療法としかなり得ない。血栓、塞栓にはワルファリンなどの抗凝固薬が使用されるが、これも対症療法に過ぎない。外科的療法として、ペースメーカー、埋め込み型除細動器、補助循環装置(バイパス)、心臓移植などが行われているが、心臓移植以外は根治的とはいえず、ドナー不足が深刻な現在、心臓移植にも限界が存在する。本発明の治療技術は、このような拡張型心筋症などにも有効であり、画期的な治療効果をもたらす。

【0197】

本明細書において「肥大型心筋症」(hypertrophic cardiomyopathy; HCM)は、心筋の異常な肥厚および左心室肥大による拡張期コンプライアンスの低下を主な症状とする心筋症をいう。心収縮機能は通常保たれている。5年および10年の生存率は、それぞれ約90%、約80%であり、良好であるが、突然死の原因とされており、臨床上の問題となっていることから、その根治的治療が求められている。本発明の治療技術は、このような肥大型心筋症などにも有効であり、画期的な治療効果をもたらす。

【0198】

本明細書において「拡張相肥大型心筋症」とは、肥大型心筋症のうち、経過中に心筋の線維化が進み、心室壁の菲薄化、収縮力の低下が生じ、心室内腔の拡張をきたして拡張型心筋症のような症状を呈したものをいう。きわめて予後不良といわれているが、無症状のものも多数存在しており、臨床上の問題となっている。従って、この拡張相肥大型心筋症もまた、根治的治療が求められている。本発明の治療技術は、このような拡張相肥大型心筋症などにも有効であり、画期的な治療効果をもたらす。

【0199】

上述のような難治性心不全の従来の治療および診断法などについては、循環器疾患最新の治療2002-2003、篠山重威、矢崎義雄編、南江堂、2002などに記載されて

いる。つい最近に刊行された循環器疾患最新の治療2002-2003、篠山重威、矢崎義雄編、南江堂、2002に記載されているように、難治性心不全については、根治的治療がなく、本発明はこのような心疾患、特に難治性心不全に対して初めて治療法を提供したという効果を奏する。

【0200】

本明細書において「予防」(prophylaxisまたはprevention)とは、ある疾患または障害について、そのような状態が引き起こされる前に、そのような状態が起こらないようにするか、そのような状態を低減した状態で生じさせるかまたはその状態が起こることを遅延させるように処置することをいう。

【0201】

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。本明細書では「根治的治療」とは、病的過程の根源または原因の根絶を伴う治療をいう。従って、根治的治療がなされる場合は、原則として、その疾患の再発はなくなる。

【0202】

本明細書において「予後」とは、予後の処置ともいい、ある疾患または障害について、治療後の状態を診断または処置することをいう。

【0203】

好ましい実施形態では、本発明の人工組織は、三次元方向に生物学的に結合されている。ここで、生物学的結合は、本明細書において他の場所において説明されており、例えば、細胞外マトリクスによる物理的結合、電気的結合などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では特に、組織の強度という点から細胞外マトリクスによる物理的結合が重要である。

【0204】

1つの実施形態において、本発明の人工組織は、従来の人工組織とは、細胞を含むという点で異なることができる。特に、細胞密度が、例えば、 $1.0 \times 10^6 / \text{cm}^2$ までも含めることができるという点でその高密度性が留意されるべきである。

【0205】

好ましくは、本発明の人工組織は、実質的に細胞または該細胞に由来する物質から構成される。実質的に細胞および細胞に由来する物質(例えば、細胞外マトリクス)のみから構成されることによって、生体適合性および生体定着性を上げることができる。ここで、細胞に由来する物質は、代表的に細胞外マトリクスを含む。特に、人工組織では、細胞と細胞外マトリクスが適切な割合で含まれていることが好ましい。そのような適切な割合とは、例えば、細胞と細胞外マトリクスとの比が1:9~9:1、好ましくは、3:7~7:3、より好ましくは3:7~5:5程度である。好ましい比率は、目的とする処置によって変動するが、そのような変動は、当業者には自明であり、目的とする臓器における細胞および細胞外マトリクスの比率を調査することによって、推定することができる。

【0206】

別の実施形態において、本発明の人工組織は、単離されていることが好ましい。単離とは、この場合、培養に用いた足場、支持体、培養液などから分離されていることを意味する。足場などの物質が実質的に存在しないことによって、本発明の人工組織は、移植後の免疫拒絶反応、炎症反応などの有害反応を抑えることができる。

【0207】

他の実施形態において、本発明の人工組織は、無傷であることが好ましい。傷のない人工組織は、本発明において初めて提供された、三次元化促進因子を用いた人工組織生産法によって実質的に初めて提供可能となった。なぜなら、従来は、人工組織を培養環境から剥離する際、どうしても組織そのものに物理的刺激を与えざるを得ず、その際必然的に傷が付かざるを得ない状態になっていたからである。このような傷がついた組織は、移植手術に耐えることができない。従って、従来方法で調製された細胞シートは、複数重ねて利

用するということが試みられていた。しかし、複数重ねて使用しても実際の移植に容易に利用できる状態にならない。従って、このような問題点を本発明の人工組織はこの無傷性によって達成する。無傷性は、例えば、心臓の手術、関節、半月、軟骨などの手術においても重要であり得る。

【0208】

好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、大型である。大型とは、通常移植対象の部位を覆うに十分な面積を有することをいう。そのような面積は、例えば、少なくとも 1 cm^2 以上であり、より好ましくは、少なくとも 2 cm^2 以上であり、少なくとも 3 cm^2 以上であり、少なくとも 4 cm^2 以上であり、さらに好ましくは少なくとも 5 cm^2 以上であり、あるいは少なくとも 6 cm^2 以上であることがさらに好ましい。

【0209】

好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、肉厚である。肉厚とは、通常移植対象の部位を覆うに十分な強度を有する程度の厚みをいう。そのような面積は、例えば、少なくとも約 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上であり、より好ましくは、少なくとも約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上であり、少なくとも約 $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上であり、少なくとも約 $300\text{ }\mu\text{m}$ 以上であり、さらに好ましくは少なくとも約 $400\text{ }\mu\text{m}$ 以上であり、あるいは少なくとも約 $500\text{ }\mu\text{m}$ または約 1 mm であることがさらに好ましい。

【0210】

本発明の人工組織は、無孔であることが好ましい。無孔の人工組織は、移植に適しているからである、特に、覆う必要がある袋状組織の欠損部位を補強するために好ましい。

【0211】

別の実施形態において、本発明の人工組織は、可撓性である。可撓性であることによって、特に、運動性の臓器の補強に適切となる。そのような臓器としては、例えば、心臓、血管、筋肉などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0212】

別の実施形態において、本発明の人工組織は、伸縮性を有する。伸縮性を有することによって、伸び縮みする臓器、例えば、心臓、筋肉などにおける適用が可能となる。このような伸縮性は、従来の方法で調製された細胞シートなどでは達成されなかった性質である。好ましくは、本発明の人工組織は、心臓の拍動運動に耐え得る強度を有する。そのような拍動運動に耐え得る強度とは、例えば、少なくとも天然の心筋が有する強度の少なくとも約 50% 以上、好ましくは少なくとも約 75% 以上、より好ましくは少なくとも約 100% 以上であることが挙げられるがそれらに限定されない。

【0213】

好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、三次元方向すべてに生物学的結合がある。従来の方法で調製された人工組織は、二次元方向には生物学的結合がある程度見られるものがあつたが、三次元方向にあつた組織は調製されていない。従って、本発明の人工組織は、このように三次元方向すべての生物学的結合を有することによって、どのような用途においても実質的に移植可能という性質がもたらされる。

【0214】

本発明の人工組織において指標となる生物学的結合としては、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合、細胞間情報伝達の存在が挙げられるがそれらに限定されない。細胞外マトリクスの相互作用は細胞間の接着を顕微鏡で適宜染色して観察することができる。電気的結合は、電位を測定することによって観察することができる。

【0215】

好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、臨床適用することができる組織強度を有する。臨床適用することができる組織強度は、適用が意図される部位に応じて変動する。そのような強度は、当業者が本明細書の開示を参照して、当該分野における周知技術を参酌することによって決定することができる。例えば、好ましい実施形態では、本発明において要求される強度は、臨床適用が意図される部分の組織強度の少なくとも 80% 以上である。このような組織強度は、例えば、対応する天然の部位の組織の強度に対して相

対評価することができる。例えば、心臓であれば、本発明の人工組織は、移植されるべき臓器（心臓）の対応する部分がつべき強度（例えば、最大荷重）に対して比較することによって、評価することができる。本発明の人工組織は、天然の組織の、通常、少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも100%の強度があることが好ましいことが理解される。

【0216】

別の実施形態において、本発明の人工組織の強度は、自己支持性を有するに十分であることが好ましい。従来の人工組織は、作製後、自己支持性を有していなかった。従って、従来の人工組織を移動させると、少なくとも一部が損傷していた。しかし、本発明の技術を用いた場合、自己支持性を有する人工組織が提供された。従って、本発明は、従来技術では提供できなかった人工組織を提供する。そのような自己支持性は、0.5~3mmの先端（好ましくは、1~2mmの太さの先端、さらに好ましくは1mmの太さの先端）を有するピンセットで組織をつまみあげたときに、実質的に破壊されないことが好ましい。ここで、実質的に破壊されないとは、目視によって確認することができるが、上記条件にてつまみ上げた後に、例えば、水漏れ試験を行ったときに、水が漏れないことなどによって確認することができる。あるいは、上述のような自己支持性は、ピンセットではなく、手でつまみあげたときに破壊されないことによっても確認することができる。

【0217】

特定の実施形態において、上記臨床適用が意図される部分としては、心臓、骨、関節、軟骨、半月、腱、靱帯、腎臓、肝臓、滑膜などが挙げられるがそれらに限定されない。滑膜から作製した人工組織の場合、骨、軟骨、半月、腱、靱帯などに適用され得る。筋芽細胞から作製した人工組織の場合、心臓などに適用されることが理解される。半月、軟骨などに適用される本発明の人工組織は、好ましくは、少なくとも1.5Nの最大荷重の強度を有することが好ましい。

【0218】

別の局面において、本発明は、細胞から人工組織を生産するための細胞培養組成物を提供する。この細胞培養組成物は、細胞を維持または増殖させるための成分（例えば、市販される培地など）；および三次元化促進因子を含む。このような三次元化促進因子に関する説明は、上述の人工組織生産法において詳述した。従って、この三次元化促進因子は、アスコルビン酸またはその誘導体（例えば、アスコルビン酸1リン酸またはその塩、アスコルビン酸2リン酸またはその塩、L-アスコルビン酸またはその塩など）を含む。ここで、本発明の培養組成物において含まれるアスコルビン酸2リン酸またはその塩は、少なくとも0.1mMで存在するか、あるいは濃縮培養組成物の場合は、調製時に少なくとも0.1mMとなるように含まれている。あるいは、この最低限度の濃度は、0.01mM、0.05mMであり得、または0.2mM、もしくは0.3mMであり得る。さらに好ましくは最低限度の濃度は、0.5mMであり得、あるいは1.0mMであり得る。さらに好ましくは、アスコルビン酸2リン酸は、少なくとも2.0mM含まれ、より好ましくは少なくとも3.0mM含まれ、最も好ましくは少なくとも5.0mM含まれることが有利である。

【0219】

別の実施形態では、本発明の組成物は、アスコルビン酸1リン酸またはその塩を含む。ここで、本発明の培養組成物において含まれるアスコルビン酸1リン酸またはその塩は、少なくとも0.1mMで存在するか、あるいは濃縮培養組成物の場合は、調製時に少なくとも0.1mMとなるように含まれている。あるいは、この最低限度の濃度は、0.01mM、0.05mMであり得、または0.2mM、もしくは0.3mMであり得る。さらに好ましくは最低限度の濃度は、0.5mMであり得、あるいは1.0mMであり得る。さらに好ましくは、アスコルビン酸2リン酸は、少なくとも2.0mM含まれ、より好ましくは少なくとも3.0mM含まれることが有利である。

【0220】

好ましい実施形態では、本発明の細胞ピア要素生物中の三次元化促進因子は、アスコル

ビン酸 1 リン酸またはその塩およびアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩を含む。

【0221】

本発明において使用されるアスコルビン酸 2 リン酸は、アスコルビン 1 リン酸と共存して用いられる。この場合、使用されるアスコルビン酸 1 リン酸とアスコルビン酸 2 リン酸とは、特定の比率で用いることが好ましくあり得る。そのような好ましい比率としては、例えば、1:10~10:1 の範囲内が挙げられる。あるいは、好ましい比率としては、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩のモル量がアスコルビン酸 2 リン酸またはその塩よりも少ないという関係を挙げることができる。別の好ましいモル比としては、例えば、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とが、1:2~1:10、1:3~1:7、約 1:5 のモル比であることなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0222】

絶対量で表示される場合、本発明において含まれる三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 0.1 mM および 0.5 mM 以上含む。より好ましくは、本発明において含まれる三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩と、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩とを、それぞれ 1.0 mM および 5.0 mM 以上含む。

【0223】

別の実施形態において、本発明において使用される三次元化促進因子は、アスコルビン酸 2 リン酸を含む。アスコルビン酸 2 リン酸を明示的に加えて組織形成を行ったという報告はなされていない。本発明では、アスコルビン酸 2 リン酸を一定量加えることによって、生産される細胞外マトリクスが多すぎず、その組成も移植可能にする程度となり、従って、細胞と細胞外マトリクスとの比率が移植可能な程度の強度などを保持させることを達成したという予想外の効果が奏される。

【0224】

好ましい実施形態では、本発明において使用されるアスコルビン酸 2 リン酸は、通常少なくとも 0.01 mM で存在し、好ましくは少なくとも 0.05 mM で存在し、さらに好ましくは少なくとも 0.1 mM で存在する。より好ましくは少なくとも 0.2 mM の濃度で、さらに好ましくは少なくとも 0.5 mM の濃度で存在することが好ましい。さらに好ましくは最低限度の濃度は、1.0 mM であり得る。

【0225】

別の実施形態において、本発明において使用される三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸を含む。アスコルビン酸 1 リン酸を明示的に加えて組織形成を行ったという報告はなされていない。本発明では、アスコルビン酸 1 リン酸を一定量加えることによって、生産される細胞外マトリクスが多すぎず、その組成も移植可能にする程度となり、従って、細胞と細胞外マトリクスとの比率が移植可能な程度の強度などを保持させることを達成したという予想外の効果が奏される。

【0226】

ある好ましい実施形態では、本発明において使用される三次元化促進因子は、アスコルビン酸 1 リン酸またはその塩、アスコルビン酸 2 リン酸またはその塩および L-アスコルビンまたはその塩を含む。

【0227】

別の好ましい実施形態において、本発明において含まれるべき三次元化促進因子は、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 0.1 mM の濃度で存在し、より好ましくは、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 1.0 mM の濃度で存在し、さらに好ましくは、細胞 10^6 細胞あたり、少なくとも 5.0 mM の濃度で存在する。

【0228】

細胞密度については、特に限定されないが、1つの実施形態において、細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞~ 5×10^7 細胞で配置される。この条件は、例えば、筋芽細胞に適用され得る。この場合、三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される

ことが好ましい。厚い人工組織が作成可能であるからである。この場合、濃度を増やすと、細胞外マトリクスでぎっしり詰まった人工組織が形成される。少ない場合は、細胞外マトリクスに隙間があるが、自己支持性は保たれる。

【0229】

好ましい実施形態では、本発明の人工組織作製方法において、細胞は、 10 cm^2 あたり、 5×10^6 細胞～ 5×10^7 細胞で配置され、代表的には、三次元化促進因子は、 0.5 mM ～ 10 mM 提供される。三次元化促進因子は、細胞の細胞外マトリクス産生において最適濃度が存在し、多すぎると適切な産生がなされない可能性があるからである。

【0230】

より好ましい実施形態では、本発明の人工組織技術において、細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞（ 5×10^6 細胞を超え 5×10^7 細胞未満の濃度）で配置され、三次元化促進因子は、少なくとも 0.5 mM 提供される。この細胞密度であれば、自己支持性のある人工組織が生産されることが観察されている。

【0231】

別の好ましい実施形態では、本発明の人工組織技術において、細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞（ 5×10^6 細胞を超え 5×10^7 細胞未満の濃度）で配置され、三次元化促進因子は、少なくとも 5 mM 提供される。この細胞密度に加え、より多くの三次元化促進因子を添加することによって、強度、自己支持性、厚みなどが増すことが観察されている。特に、細胞間の接着に重要な役割を果たす細胞外マトリクスの密度が顕著に上昇することから、移植可能性が顕著に増すことが理解される。

【0232】

別の好ましい実施形態では、本発明の人工組織技術において、細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸およびアスコルビン酸2リン酸を含み、アスコルビン酸1リン酸は少なくとも 0.1 mM 提供され、アスコルビン酸リン酸は少なくとも 0.5 mM 提供される。このような特定の条件を取ることで、特に、筋芽細胞などでは、自己支持性が保障された人工組織を作製することができた。このような自己支持性がある人工組織は従来の技術では作製不可能であったことであり、その意義は深い。

【0233】

より好ましくは、本発明の人工組織技術において、細胞は、 10 cm^2 あたり、約 1×10^7 細胞で配置され、三次元化促進因子は、アスコルビン酸1リン酸およびアスコルビン酸2リン酸を含み、アスコルビン酸1リン酸は少なくとも 1.0 mM 提供され、アスコルビン酸リン酸は少なくとも 5.0 mM 提供される。このような特定の条件を取ることで、特に、筋芽細胞などでは、厚みのある自己支持性が保障された人工組織を作製することができた。このような自己支持性があり、厚みのある人工組織は従来の技術では作製不可能であったことであり、その意義は深い。

【0234】

（「巻く」ための人工組織）

別の局面において、本発明は、動物の生体の部分を補強するための人工組織を提供する。このような補強を行うことができる人工組織は、本発明の人工組織生産法によって初めて達成された技術である。本発明の人工組織は、自己支持性を有することから、従来提供されなかったような用途（例えば、全体の補強、充填補強、漏れの無い補強）にも使用可能である。

【0235】

好ましい実施形態では、上記部分は、袋状臓器を含む。袋状臓器では、無傷性および／または無孔性という性質が人工組織にとって重要であり、そのような性質を有する人工組織であって、一定の大きさを持つような組織は従来提供されていない。従って、上述のような本発明の人工組織が提供されたことによって初めて袋状臓器の実質的な治療が可能になったといえる。従って、袋状臓器については、特定の疾患（例えば、何時精神疾患（例えば、拡張型心筋症など）など）の場合、初めて臓器移植以外の治療が可能になったとい

える。

【0236】

特定の実施形態では、上記袋状臓器は、心臓、肝臓、腎臓などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0237】

本発明の特定の実施形態において、上記補強は、上記部分を覆うように本発明の人工組織を配置することによって達成され得る。従来の方法で提供される人工組織は、このような覆うことによる処置（すなわち、「巻く」用法）が不可能であったことから、本発明の人工組織は、従来技術で達成不可能であった用途を提供することになる。

【0238】

従って、そのような特定の実施形態において、本発明の人工組織は、上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する。

【0239】

好ましい実施形態において、本発明の人工組織は、生物学的結合を有することが有利である。

【0240】

別の好ましい実施形態において、生物学的結合は、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合、細胞間の情報伝達のうち少なくとも1つを含む。

【0241】

別の好ましい実施形態において、本発明の補強用人工組織は、三次元化促進因子の存在下で細胞を培養することによって形成される。

【0242】

別の実施形態において、本発明の補強用人工組織は、処置該当される動物（例えば、ヒト）に由来する細胞（自己細胞）を含む。より好ましくは、本発明の補強用人工組織は、処置該当される動物（例えば、ヒト）に由来する細胞（自己細胞）のみを細胞として含む。

【0243】

（「巻く」治療法）

別の局面において、本発明は、動物の生体の部分を補強するための方法を提供する。この方法は、A) 人工組織を、該部分を覆うように配置する工程；およびB) 該人工組織と該部分とが生物学的に結合するに十分な時間保持する工程、を包含する。ここで、ある部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。ここで、十分な時間は、その部分と人工組織との組み合わせによって変動するが、当業者であれば、その組み合わせに応じて適宜容易に決定することができる。このような時間としては、例えば、術後1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、1年などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、人工組織は、好ましくは実質的に細胞およびそれに由来する物質のみを含むことから、特に術後に摘出する物質が必要であるというわけではないので、この十分な時間の下限は特に重要ではない。従って、この場合、長ければ長いほど好ましいといえるが、実質的には極端に長い場合は、実質的に補強が完了したといえ、特に限定する必要はない。本発明の人工組織はまた、自己支持性を有することから、ハンドリングが楽で、実際の処置時に破壊されず、手術も容易であるという特徴も有する。

【0244】

別の実施形態において、本発明の補強方法では、上記部分は、袋状臓器（例えば、心臓、肝臓、腎臓など）を含むことが好ましい。そのような袋状組織の補強には、巻くこと（損傷部分を覆うこと）が必要である。巻く用途で抵抗可能な人工組織は、本発明によって初めて提供された。従って、本発明の補強方法は、従来達成されなかった画期的な方法を提供することになる。あるいは、上記部分は、骨または軟骨を含み得る。そのような例としては、半月、靱帯、腱などを挙げることができるがそれらに限定されない。本発明は、従来強度が不十分で移植しても不十分な結果しか上げることができなかった手術において、

十分な強度を与えることによって、骨、軟骨などでも十分な治療効果を上げることができた。本発明の補強方法は、心臓、骨、軟骨、靱帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防、予後または強化するものであり得る。

【0245】

特に、本発明の補強方法では、本発明の人工組織は、上記部分の伸縮に対して抵抗性を有する。このような伸縮の例としては、心臓の拍動運動、筋肉の収縮などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0246】

別の好ましい実施形態では、本発明の補強方法では、本発明の人工組織は、生物学的結合（例えば、細胞外マトリクスの相互結合、電気的結合、細胞間の情報伝達など）を含む。この生物学的結合は、三次元方向すべてにおいて有されていることが好ましい。

【0247】

別の好ましい実施形態において、本発明の補強方法は、三次元化促進因子の存在下で細胞を培養して本発明の人工組織を形成する工程をさらに包含する。このような三次元化促進因子の存在下での培養を包含する方法の移植・再生技術は、従来提供されていなかった方法であり、このような方法によって、従来治療が不可能とされていた疾患（例えば、難治性心疾患（例えば、拡張型心筋症など））を治療することができるようになった。

【0248】

好ましい実施形態において、本発明の補強方法において、本発明の人工組織において使用される細胞は、移植が意図される動物に由来する細胞（すなわち、自己細胞）である。自己細胞の使用により、免疫拒絶反応などの有害な副作用を回避することができる。

【0249】

別の好ましい実施形態では、本発明の補強方法が対象とする部分は心臓である。この心臓は、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害を伴う。

【0250】

一部の臓器について、特定の疾患、障害および状態は、その治療について根本的な治療が困難といわれるものがある（例えば、難治性心疾患など）。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた処置が可能となり、根本的な治療にも応用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の医薬で達成不可能であった有用性を有するといえる。

【0251】

このように、本発明は、動物の生体の部分を処置するための方法であって、A) 人工組織を、該部分を覆うように配置する工程；およびB) 該生体の部分の状態が改善するに十分な時間その人工組織を保持する工程、を包含する、方法を提供する。このような状態の改善は、処置されるべき部分の機能に応じて判定することができる。例えば、心臓であれば、心機能（心拍、血流など）を見ることによって状態の改善を判定することができる。骨であれば、レントゲン、CTスキャンなどによって石灰化を観察することによって状態の改善を判定することができる。骨の場合、その強度を測定したり、MRIにより骨髄および/または骨質の評価を行うことによって状態の改善を判定することができる。軟骨・半月であれば、関節鏡検査により関節表面を観察することができる。さらに、関節鏡視下にて生体力学検査を行うことによって状態の改善を判定することができる。また、MRIによって修復状態を確認することによって状態の改善を判定することも可能である。靱帯に関しては、関節制動性検査により動揺性が存在するかどうかを確認することによって判定することができる。また、MRIによって組織の連続性を確認することによって状態の改善を判定することができる。いずれの組織の場合も、組織生検を行い組織学的評価を行うことによって状態が改善したかどうかを確認することができる。

【0252】

好ましい実施形態において、この処置は、心臓、骨、軟骨、靱帯、腱または半月の疾患、障害または状態を処置、予防、予後または強化するものである。好ましくは、この人工

組織は、自己支持性を有する。これらの人工組織としては、当業者は、本明細書において、上述した任意の形態およびその改変体を用いることができる。

【0253】

(併用療法)

別の局面において、本発明は、HGFのようなサイトカインと人工組織とを併用することによる再生療法を提供する。

【0254】

本発明で使用されるサイトカインはすでに市販されているが(例えば、東洋紡(株) HGF-101等)、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができる。HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることもできる。或いは、遺伝子工学的的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組み換えHGFを得ることができる(例えば、Nature、342、440(1989)、特開平5-111383号公報、Biochem-Biophys. Res. Commun.、163;967(1989)等を参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母または動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたHGFは、天然型HGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/または付加されていてもよい。患者への導入方法としては、例えば、本発明においてHGFの導入方法として、安全かつ効率の良い遺伝子導入法であるセンダイ・ウィルス(HVJ)リポソーム法(Molecular Medicine、30、1440-1448(1993)、実験医学、12、1822-1826(1994))、電気的遺伝子導入法、ショットガン方式遺伝子導入法等があげられる。好ましくは、HVJリポソーム法が使用される。別の好ましい実施形態では、タンパク質形態を用いることができる。

【0255】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0256】

本実施例において、動物の取り扱いは、大阪大学において規定される基準を遵守し、動物愛護精神に則って実験を行った。

【0257】

(実施例1: 心筋細胞シートでの人工組織および三次元構造体の作製および利用—組織操作した収縮性心筋細胞シートは、障害心筋層を再生する)

(生体操作した収縮性心筋細胞シートは、梗塞心筋層と統合してこれを再生する)

本実施例において、本発明者らは、(1)心筋細胞シート(人工組織)は、移植後に生存し、かつ障害心筋層との組織学的電気的結合を示すか否か; (2)移植した心筋細胞シート(人工組織)は、心機能の改善を誘導し得るか否かという特定の課題について検証し、それぞれ、電気的結合を示すことおよび心機能改善をもたらすことを実証した。

【0258】

本発明者らは、障害心筋層の処置に対して、生体操作した組織移植の概念を導入した。足場を有さない組織操作した収縮性心筋細胞シートが、障害心筋層との組織学的電気的統合を示し、梗塞心筋層の再生をもたらしたことを実証した。

【0259】

(結論)

新生児ラットの心筋細胞を使用する人工組織は、障害心筋層と統合し、虚血心筋層モデルにおいて心機能を改善した。本発明者らは心筋細胞を使用した、細胞シート技術を使用して組織化した人工組織は、組織移植の新規な概念として、再生医療の分野において有

望であり得る。この方法は、図1に模式化されて示されている。

【0260】

(材料および方法)

(心筋梗塞モデル)

30匹のLewis系統の雄性ラット(300g、8週齢; Seac Yoshitomi Ltd, Fukuoka, Japan)を、本研究のために使用した。人道的な動物の世話は、National Society for Medical researchにより規定された「Principles of Laboratory Animal Care」およびInstitute of Laboratory Animal Resourceにより準備されNational Institute of Healthにより刊行された「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication No.86-23、1985年改訂)に従った。急性心筋梗塞を、他所[Weisman HF, Bush DE, Manisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanism of myocardial infarct expansion. Circulation. 1988;78:186-201]で記載されたようにして誘導した。簡単に述べると、ラットを、ペントバルビタールナトリウムで麻酔し、そして気管内チューブを通して、陽圧呼吸を適用した。第4左肋間隙にて胸郭を開胸し、8-0ポリプロピレン結紮糸によって、LADの起点から3mm遠位にて、LADを完全に結紮した。

【0261】

(矩形に設計したPIPAAmグラフティングポリスチレン細胞培養皿の調製)

矩形に設計したPIPAAmグラフティング細胞培養皿の調製のための特定の手順は、他所[非特許文献10]に記載されている。簡単に述べると、2-プロパノール溶液中のIPAAmモノマー(Kohjin, Tokyo, Japanにより親切にも提供された)を、組織培養ポリスチレン(TCPS)皿(Falcon 3002, Becton Dickinson)上に広げた。その後、これらの皿を、Area Beam Electron Processing System(Nisshin High Voltage)を使用する照射(0.25MGy電子ビーム線量)に供し、IPAAmの重合およびこの皿表面へのIPAAmの共有結合を生じさせた。これらのPIPAAmグラフティング皿を、冷たい蒸留水でリンスして、グラフティングしていないIPAAmを除去し、この皿を窒素ガス中で乾燥させた。第2工程において、このPIPAAmグラフティング表面を、矩形のカバーガラス(24×24mm、Matsunami, Tokyo, Japan)でマスクした。2-プロパノール中のアクリルアミド(AAm)モノマー溶液を、このマスクした皿表面上に広げた。その後、この皿表面に、電子ビームを照射し、そして洗浄した。結果として、各皿の中心の矩形領域は、PIPAAmグラフティングされており(温度応答性であり)、周囲の境界は、ポリ-AAmグラフティングされていた(非細胞接着性であった)。矩形の構成をしたPIPAAmグラフティング皿を、培養中で使用する前に、エチレンオキシドによりガス滅菌した。

【0262】

(新生児ラット心室筋細胞の初代培養物)

初代新生児ラット心筋細胞を、以前に刊行された手順[非特許文献12]に従って調製した。簡単に述べると、1日齢～2日齢の新生児ラットを、深く麻酔して屠殺し、その心臓を迅速に取り出し、コラゲナーゼ(クラスII、Worthington Biochemical)を含むハンクス溶液中で37℃にて消化した。単離した細胞を、6% FBS、40% Medium 199(Gibco BRL)、0.2%ペニシリンーストレプトマイシン溶液、2.7mmol/Lグルコース、および54%平衡塩類溶液(116mmol/L NaCl、1.0mmol/L NaH₂PO₄、0.8mmol/L MgSO₄、1.18mmol/L KCl、0.87mmol/L CaCl₂、および26.2mmol/L NaHCO₃を含む)を含む培養培地中に、懸濁した。この細胞懸濁物を、細胞密度8×10⁶/皿でプレーティングし、5% CO₂を含む加湿雰囲気下で37℃にてインキュベートした。

【0263】

(線維芽細胞の初代培養物)

初代線維芽細胞を、以前に刊行された手順[Z.Yablonka-Reuveni, M.Nameroff. Skeletal

muscle cell populations. Separation and partial characterization of fibroblast-like cells from embryonic tissue using density centrifugation. Histochemistry. 1987;87:27-38] に従って調製した。簡単に述べると、8週齢のLewisラットの脚の筋肉由来の細胞懸濁物を、PercolTM (Amersham Biosciences Sweden) 密度遠心分離により、線維芽細胞と筋細胞とに分離した。単離した線維芽細胞を、コントロール線維芽細胞シートのために使用した。

【0264】

(心筋細胞シートの作製)

単離した新生児ラットの心筋細胞を、矩形に設計したPIPAAmグラフティングポリスチレン細胞培養皿上で培養し、そして温度を20℃まで低下させることによって矩形の細胞シートとして剥離させた。そして2つの心筋細胞シートを重ねて、より厚い心臓移植片を作製した。二重層心臓シートの断面観察は、密接した結合と均質な心臓様組織を示した。四重層心筋細胞シートの同期した運動が、肉眼で検出された(データは示さず)。線維芽細胞シートの場合、単離した線維芽細胞を、同じ皿上で2日間培養し、そして同じ方法によって、矩形の細胞シートとして剥離した。

【0265】

(心筋細胞シートの移植)

心筋細胞シート移植を、LewisラットのLAD結紮の2週間後に実施した。全身麻酔下に、この調査中のラットを、第4左肋間隙を介して曝した。その梗塞領域を、表面瘻痕および壁運動の異常を基にして可視的に同定した。心筋細胞シートまたは線維芽細胞シートを、梗塞心筋層中に移植した。コントロール群には、処置しなかった。

【0266】

移植の2週間後、4週間後、および8週間後に、心機能を評価した。移植の8週間後、心臓を採取し、切片化し、そして組織学的検査および免疫組織学的検査のために処理した。

【0267】

移植した心筋細胞シートの同定のために、EGFP新生児ラット心筋細胞を、同じプロトコルにより単離し、そして心筋細胞シートを作製した。本発明者らは、EGFP新生児ラット心筋細胞シートを、ヌードラットの梗塞心筋層に移植した。本発明者らは、その梗塞心筋層において、EGFP陽性心筋細胞を検出し得た(図6左下および右下)。

【0268】

(ラット心臓の心機能の測定)

ラットに、ベントバルビタールナトリウムで麻酔した。麻酔にエタノールを補充して、軽度の麻酔を維持した。ラットを、仰臥位で軽く固定し、前胸部を剃毛した。心臓超音波検査を、市販の心エコーSONOS 5500 (PHILIPS Medical Systems, USA) を用いて実施した。12-MHzの環状アレイ変換器を、左半胸郭に適用した音響カップラゲル層上に配置した。胸部への過度の圧力を避けつつ十分な接触を維持するように、注意を払った。ラットを、浅い左側面位で画像化した。まず、心臓を、最大左心室(LV)直径のレベルで、短軸断面にて2次元モードで画像化した。収縮左心室(LV)面積および拡張左心室(LV)面積を、同じ時間で決定した。左心室(LV)容量を、左心室(LV)短軸面積により評価した[非特許文献15: Gorcsan J 3rd, Morita S, Mandarino WA, Deneault LG, Kawai A, Kormos RL, Griffith BP, Pinsky MR. Two-dimensional Echocardiographic Automated Border Detection Accurately Reflects Changes in Left ventricular Volume. J Am Soc Echocardiogr. 1993; 6: 482-9]。この画像は、左心室(LV)前壁および左心室(LV)後壁に対して垂直にMモードカーソルを位置付けるために使用した。すべての測定は、モニターを使用してオンラインで行った。拡張測定は、見かけの最大左心室(LV)拡張寸法の時期に行った。左心室(LV)収縮末期寸法

を、左心室 (LV) 後壁の最も前方に収縮した軌跡の時期に測定した。左心室 (LV) 拡張寸法 (LVDd) および左心室 (LV) 収縮寸法 (LVDs) を測定した。寸法データおよび面積データは、選択した 2 拍動または 3 拍動の測定値の平均として表す。左心室 (LV) 駆出率 (EF) を、

$$LVEF(\%) = [(LVDd^3 - LVDs^3) / LVDd^3] \times 100$$

として計算した。LV%内径短縮率 (FS) を、

$$LV\%FS = [(LVDd - LVDs) / LVDd] \times 100$$

として計算した。

【0269】

(カラーキネシスを用いる、局所的左心室壁運動のエンドカルジオグラフィ定量)

カラーキネシスは、この技術の拡大部分である。カラーキネシスは、リアルタイムで心臓内運動を自動的に探知しそして提示する手段として、連続的音波フレーム間の組織の後方散乱値を比較する。カラーキネシスを、市販の超音波システム (SONOS 5500, PHILIPS Medical Systems, USA) に組み込んだ [非特許文献 16: Robert ML, Philippe V, Lynn W, James B, Claudia K, Joanne S, Rick K, David P, Victor MA, et al. Echocardiographic quantification of regional left ventricular wall motion with color kinesis. Circulation. 1996; 93:1877-1885]。

【0270】

すべての研究対象において、12-MHz 環状アレイ変換器を用いて超音波画像化を実施した。側面位にて呼気終期の間に、胸骨傍短軸を得た。画像の質を最適にした後、心臓境界検出のための超音波定量システムを起動させた。利得制御 (全利得および側方利得、時間利得補償) を調整して、予め規定した目的の領域内の血液-心臓内境界面の探知を最適にした。その後、カラーキネシスを、心収縮期全体を通して心臓内軌跡のオンラインカラーコード化のために起動した。心周期全体を通してカラーキネシスデータを含む画像系列を得、そのデータを、オフライン分析のために光学ディスクにデジタル形式で格納した。

【0271】

(組織学)

左心室心筋層検体を、心筋細胞シート移植後 2 週間目および 8 週間目に得た。各検体を、10% 中性ホルムアルデヒド中に配置し、そしてパラフィン中に包埋した。各検体から、2~3 個の連続切片を切断し、そして光学顕微鏡検査のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。

【0272】

血管内皮細胞を標識するために、第 VII 因子関連抗原の免疫組織化学染色を実施した。凍結切片を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS; 140 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄ を含有する蒸留水。pH 7.2 に調節) 中の 2% パラホルムアルデヒド溶液を用いて、室温にて 5 分間固定し、3% 過酸化水素を含むメタノール中に 15 分間浸漬させ、その後、PBS で洗浄した。そのサンプルを、ウシ血清アルブミン溶液 (DAKO LASB Kit, DAKO CORPORATION, Denmark) を用いて 10 分間カバーして、非特異的反応を脚ブロックした。この検体を、HRP と結合した EPOS 結合体化抗第 VII 因子関連抗原抗体 (DAKO EPOS Anti-Human Von Willebrand Factor/HRP, DAKO Denmark) とともに一晩インキュベートした。このサンプルを PBS で洗浄した後、これらを、ジアミノベンジジン溶液 (PBS 中 0.3 mg/ml のジアミノベンジジン) 中に浸漬して、陽性染色を得た。

【0273】

コネキシン 43 を検出するために、コネキシン 43 関連抗原の免疫組織化学染色を実施

した。凍結切片を、3%過酸化水素を含むメタノール中に5分間浸漬し、その後、PBSで洗浄した。この検体を、コネキシン43に対するマウスモノクローナル抗体 (CHEMICON International, Inc., USA) とともに20分間インキュベートした。このサンプルをPBSで洗浄した後、このサンプルを、ビオチン化抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark) 中に10分間浸漬し、その後、PBSで洗浄した。このサンプルを、ペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (DAKO, Denmark) 中に10分間浸漬した。サンプルをPBSで洗浄した後、このサンプルを、ジアミノベンジジン溶液 (PBS中0.3mg/mlのジアミノベンジジン) 中に浸漬して、陽性染色を得た。

【0274】

(電気組織学的分析)

電位の捕捉のための1つの微小電極 (直径100 μ m、Unique Medical Co. Ltd., Tokyo) を、心筋細胞を移植した瘢痕の上、線維芽細胞シートを移植した瘢痕の上、または処置していない瘢痕の上に、配置した。他の2つの電極を、左肋骨下領域および右大腿領域に配置した。宿主心筋層の刺激のために、2つの微小電極を、心房上に配置した。宿主心電図の検出のために、3つの電極を、胸部右上領域、左肋骨下領域および右大腿領域に取り付けた。両方の電位図を、生体電気増幅器 (UA-102、Unique Medical Co., Ltd., Tokyo) により増幅し、そしてデータ収集システム (UAS-108S, Unique Medical Co., Ltd., Tokyo) により記録した。心房を、刺激器 (NIHON KODEN, Japan) によって、速度300bpmで刺激した。その後、電位を、目的の領域中で捕捉した。

【0275】

その後、その閾値を分析するために、刺激用の2つの微小電極を、処置していない瘢痕上、心筋細胞シートを移植した瘢痕上、または線維芽細胞シートを移植した瘢痕上に、配置した。ペーシングした宿主心電図の検出のために、1つの電極を、正常な心筋層に取り付け、そして他の2つの電極を、左肋骨下領域および右大腿領域に配置した。その後、本発明者らは、同じ刺激器によって、速度300bpmにて、処置していない瘢痕、心筋細胞シートを移植した瘢痕、または線維芽細胞シートを移植した瘢痕を刺激した。

【0276】

(データの分析)

データを、平均±標準偏差 (SD) として表す。個々の群の間の差異の有意性を評価するために、ノンパラメトリック・マン-ホイットニー二標本検定を用いて、統計学的評価を実施した。統計学的有意性は、0.05未満のp値と決定した。

【0277】

(結果)

(心臓移植片の特徴)

剥離した心筋細胞シートは、細胞骨格再構成に起因して、面積が5.76cm² から1.11±0.05cm² へと縮んだ (n=3)。一方、その厚さは、20.1±0.9 μ mから52.4±6.0 μ mへと増加した (n=3)。この心臓シートは、巨視的観察によると、自然に収縮した。

【0278】

(組織学的評価)

本発明者らは、低温度下で単層心筋細胞シートを得ることができた (図6の左上)。心筋細胞シートは、移植後に結紮糸を用いずに、梗塞心筋層上にじかに付着させた (図6右上)。移植の2週間後、移植した心筋細胞シートのヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色の組織学的検査により、炎症細胞が蓄積することなく、梗塞心筋層上に整列して十分に付着したことが示された。黄色の矢印は、コラーゲンシートを示し、これは、心筋細胞シートを梗塞心筋層に送達するために必要である (図7)。移植した心筋細胞シートを移植後8週目に視察すると、移植した心筋細胞シートとレシピエント心臓との間が密接に付着

していることが明らかになった。移植の8週間後の移植した心筋細胞シートのH E染色により、心筋細胞シートと宿主心筋層とが瘢痕の中心に整列して統合したことが示された(図7右下)。免疫組織化学染色により、移植した心筋細胞シート中、および移植した心筋細胞シートとレシピエント心臓との間の接触領域周辺にある、不規則な方向のコネキシン43が示された(図7中下)。第V I I I因子免疫組織化学染色により、移植した心筋細胞シート中またはこのシートの周辺にある、多くの第V I I I因子陽性細胞が示された(図7左下)。

【0279】

(梗塞心筋層の機能的回復)

Bモード分析により、C群と比較してT群において、左心室の拡張が十分に抑制されたこと、および全体的壁運動が十分に保存されたことが、示された(図8)。ベースラインでの駆出率(EF)、内径短縮率(FS)、左心室収縮末期面積(LVESA)は、3つの群の間で有意には異ならなかった。

【0280】

移植の2週間後および4週間後、2Dエンドカルジオグラフィは、他の群と比較して、T群におけるEFおよびFSの有意な改善を示した。LVESAは、他の群においてよりもT群において有意に小さかった。これらの機能的改善は、移植の8週間後に保存された(図9)。

【0281】

(電気生理学的実験)

電気生理学的実験は、C群において脚ブロックのようなQRS波の2つのピークを示したにも関わらず、T群において、処置した瘢痕領域のQRS波の1つのピーク成分を示した(図11)。F群もまた、T群ほどではないが効果が観察された。さらに、電気生理学的実験は、F群およびC群において低振幅を示したにも関わらず、T群において、QRS群の振幅(ボルト)の改善を示した(C群対T群: 2.79 ± 0.9 V対 0.83 ± 0.64 V、 $P < 0.05$) (図11)。

【0282】

T群において、心房を、刺激器によって振動数300bpmにて刺激すると、同期した電気スパイクが、移植した領域で検出された(図10左下)。さらに、レシピエント心臓のペーシングについての閾値は、F群およびC群よりもT群において低かった(C群対F群対T群: 4.9 ± 0.9 V対 3.0 ± 0.7 V対 1.7 ± 0.5 V、 $P < 0.05$) (図10右)。このように心筋以外の部位でも電気生理学的に改善効果があることが明らかになった。

【0283】

(結果)

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)製の温度応答性ドメインを、ポリスチレン細胞培養表面上にグラフトした。新生児ラットの心筋細胞を、これらの皿上で培養し、そしてトリプシンを用いずに20℃未満で矩形の細胞シートとして剥離した。2つのシートを重層して、より厚い心臓移植片を作製した。これらの心筋細胞シートは、自然に収縮した。2つのシートの断面観察は、密接な結合と均質な心臓様組織を示した。

【0284】

左前下行枝(LAD)結紮の2週間後、以下の2つの異なる処置; 1)心筋細胞シート移植(T群、 $n=10$)、2)線維芽細胞シート移植(F群、 $n=10$)を行った。コントロール群は、処置をしなかった(C群、 $n=10$)。エンドカルジオグラフィによって、移植の2週間後、4週間後、および8週間後に、T群において心機能が有意に改善されたことが示された。カラーキネシスにより、移植前の値と比較して、局所的収縮壁運動が非常に回復されたことが示された。心筋細胞シートは、梗塞心筋層上に整列して付着し、その心筋層において均質の組織であるように見えた。免疫組織化学染色により、移植した心筋細胞シートにおいて、新脈管形成および不規則な方向を向いたコネキシン43が示された。電気生理学的実験によって、C群において脚ブロックのようなQRS群の2つのピ

ーク成分が示されたにも関わらず、T群において、R波の改善および処置した瘢痕領域におけるQRS群の1つのピークが示された。F群においても、若干の改善が見られた。さらに、レシピエント心臓のペースングの閾値は、F群およびT群においては、C群よりも低かった（C群対F群対T群：4.9±0.9V対3.0±0.7V対1.7±0.5V、 $P<0.05$ ）。

【0285】

（考察）

針注入により導入される細胞性心筋症の近年の発達により、損傷した心機能を回復するための新規なアプローチが提供された [Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regeneration of functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Med.* 1998;4:929-933]。心筋細胞シート移植法の付加された潜在的利点は、組織形成プロセス（移植片の形状、サイズ、および一貫性）の良好な制御、容易な移植技術、ならびに最小の細胞損失で多数の細胞を移植することであり、一方、注射法は、トリプシン処理によって一定量の細胞または細胞表面タンパク質（例えば、コネキシン43）の損失をもたらす。心筋細胞シート移植法は、心筋梗塞に加えて、全体的な心筋機能不全（例えば、拡張型心筋症）の修復のために有用であり得る。臨床的適用を達成するために、移植した全心筋組織量は、障害心筋層の修復のために極めて重要であり、そして新脈管形成の増強により、心臓シートをより厚くすること、およびより多くの細胞を障害心筋層に送達することが、可能になり得る。

【0286】

本実施例において、本発明者らは、足場を有さない収縮性心筋細胞シートを開発し、そして移植後の心臓の機能評価および組織学的評価を分析した。心筋細胞シートは、新脈管形成を伴って梗塞心筋層に付着した。この心筋細胞シートは、コネキシン43を発現する均質な筋細胞組織のように見え、そしてインビボで同期的に収縮する。心筋細胞シート中の心筋細胞は、移植した心筋細胞シート中で整列すること、およびほとんど炎症細胞が蓄積しないことを示した。この心筋細胞シート移植は、心臓の収縮性能および拡張性能の優れた改善をもたらす見込みがあった。電気生理学の実験により、心筋細胞シートが、瘢痕における導電率を改善すること、そして処置した瘢痕領域におけるQRS群の1つのピーク成分を再構成することが、明らかになった。これらのデータは、収縮性心筋細胞シートが、新脈管形成およびコネキシン43の発現が付随する、障害心筋層との組織学的電気的統合を示し、心機能の有意な改善を誘導するという、本発明者らの仮説を証明した。本発明者らが知る限りでは、これは、障害心筋層において、組織操作した心臓シートを使用して心筋再生治療が成功した最初の報告である。

【0287】

再生治療における統合の主要な要因は、動的統合、電気的統合、および組織学的統合である。

【0288】

動的統合に関して、移植した心筋細胞シート的心筋細胞は、梗塞心筋層において整列を示し、そして局所的および全体的な収縮機能の有意な改善を促進した。損なわれたリモデリングは、梗塞心臓における心臓の構造的変形および心機能の劣化の原因である [Tyagi SC. Extracellular matrix dynamics in heart failure: A prospect for gene therapy. *J. Cell. Biochem.* 1998;68:403-410]。Kelleyらは、梗塞心筋層上にメッシュを配置された左心室（LV）の拡張の制限が、ヒツジ心筋梗塞モデルにおいて左心室（LV）の構成および休止機能を保存することを示した [Kelley ST, Malekan R, Gorman JHら、Res training infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. *Circulation.* 1999;99:135-142]。機能不全組織における左心室（LV）構成の保存および局所的収縮機能の改善の両方が、損傷した心臓における収縮性能を修復するために必須であり得るが、それゆえ、左心室（LV）拡張の減弱のみでは、不十分な処置である。非収縮シートが収縮シートと比較して収縮性能を改善しな

かった本発明者らのデータは、この所見を支持する。さらに、本発明者らのデータは、梗塞心筋層において有意な新脈管形成を示した。心臓機能の改善に関する機構の1つは、移植した心筋細胞シートにより誘導される新脈管形成であり得る。総括すると、心筋細胞シート移植により誘導される収縮機能の有意な改善は、左心室(LV)構成の保存、局所的収縮機能の改善、および新脈管形成の誘導を担う。

【0289】

電氣的統合に関して、本発明者らの研究は、電気導電体(すなわち、コネキシン43を発現する心筋細胞シート)が、瘢痕における導電性を促進して、梗塞心筋層において、QRS群の振幅の改善、および脚ブロックのようなQRS群の2つのピーク成分の修復をもたらしたことを、示した。脚ブロックパターンは、心筋層における線維症または壊死に関連する可能性がある[Agarwal A.K., Venugopalan P. Right bundle branch block: varying electrocardiogram patterns. Aetiological correlation, mechanisms and electrophysiology. International Journal of Cardiology. 1999;71:33-39]。組織学的変化は、心電図記録におけるQRS群の振幅を反映した[Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyo-oka T, Hanaoka F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; Dec 9; 94(25):13873-8]。USにおいて示された同期的壁運動の事実、脚ブロックのようなQRS群の2つのピーク成分の修復、および瘢痕における閾値の減少は、移植した心筋細胞シートと宿主心筋層との間の電氣的接続を示し得る。この理由のために、本発明者らがトリプシンではなく温度応答性皿を使用して培養皿から細胞シートを剥離した場合、その細胞シートは、コネキシン43とその表面との良好な状態を維持した。

【0290】

組織学的統合に関して、移植した心筋細胞シートは、新脈管形成を伴う梗塞心筋層との良好な付着を示した。すでに、本発明者らは、血液細胞増殖因子による細胞/細胞相互作用および細胞/ECM相互作用の増強による組織学的統合が、梗塞心筋層の心筋再生に必須であることを示した[Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Kawaguchi N, Nakamura T, Matsura N, Matsuda H. Myocardial regeneration therapy for heart failure. Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. Circulation. 2002;105:2556-2561]。Kushidaらは、細胞シート中の接着因子は、温度応答性皿からの剥離後に十分に保存されたことを報告した[非特許文献11]。従って、これらのシートは、その表面に接着分子を良好に保存して、いくつかの器官との良好な付着および統合を示す[Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive cultured dishes augments the pulsatile amplitude. Tissue Eng. 2001;7(2):141-51; 24: von Recum HA, Kim SW, Kikuchi A, Okuhara M, Sakurai Y, Okano T. Retinal pigmented epithelium culture on thermally responsive polymer porous substrates. J Biomater Sci Polym Ed. 1998;10:1241-1254]。さらに、細胞群落を保存しての細胞の送達、注射法を介する細胞送達とは対照的に、細胞の生存および生存度にとって重要であり得る。これらの結果は、足場を有さない心筋細胞シートが、宿主心筋層とのシンチウムを生じることを示す。

【0291】

シートの細胞供給源は、臨床適用において非常に重要な問題である。近年、筋芽細胞が、細胞移植の臨床適用のために最も広範に使用されている。筋芽細胞は、心筋細胞よりも虚血を許容する可能性を有する。それゆえ、筋芽細胞は、現在のところ、臨床適用における細胞シート移植のために適切な細胞供給源のうちの1つである。

【0292】

結論として、本発明者らは、収縮性心筋細胞シートが、障害心筋層を、動的に、電氣的に、そして組織学的に、統合することを示した。

【0293】

心筋細胞シート移植は、障害心筋層における機能的性能および心臓構造を修復するための、新規かつ有望な戦略であり得る。

【0294】

線維芽細胞シートもまた、心臓細胞シートほどではないが、若干の改善を提示した。従って、少なくとも応急措置として線維芽細胞シートが利用できる可能性が示された。

【0295】

(実施例2)

(自己由来筋芽細胞シートは、障害心筋層を再生する：臨床適用への道)

組織工学における最近の進歩は、心筋以外の種々の細胞および細胞外基質から構成される、移植可能な機能的組織を提供する可能性がある。本発明者らは、自己由来筋芽細胞シートを設計した。これらのシートが、臨床適用の点で有益であり得ると、本発明者らは考え、本実施例では、筋芽細胞を材料として用いて人工組織または三次元構造体を構築し、その医療応用における効果を実証した。

【0296】

(方法)

左前下行枝(LAD)を2週間結紮することによって、28匹のラットにおいて、損傷心臓を作製した。高分子(N-イソプロピルアクリルアミド)製の温度応答性ドメインで、培養皿上をコーティングした。脚筋肉から単離した骨格筋芽細胞(SM)を培養し(図12を参照)、20℃にて単一の単層細胞シート(組織)として皿から脱着した(図13)。9匹のラットにおいて2つの筋芽細胞シート移植(筋芽細胞シート(S)群=10⁷細胞)を行った；9匹のラットにおいて筋芽細胞注入(I群=10⁷細胞)を行った；10匹のラットにおいて非細胞治療(C群=培地のみの注入)を行った(図14および16を参照)。

【0297】

(心機能の測定)

ラットを麻酔し、手術後14日目および28日目に、心機能をモニターした。12-MHzで操作する環状アレイ変換器を備えた超音波機器(Sonos 5500)を使用して、エンドカルジオグラフィを実施した(図18)。B画像化モードおよびM画像化モードにおける胸骨傍短軸画像および胸骨傍長軸画像を実施した。前壁圧に加えて、全体的パラメーター(例えば、左心室拡張末期直径、左心室収縮末期直径、内径短縮率および駆出率)を測定した(図14を参照)。

【0298】

(組織学)

2週間後および4週間後、過量のペントバルビタールによってラットを殺傷し、その心臓を切除し、10%ホルマリンで固定し、そしてパラフィン中に包埋した。低温槽を使用することによって、心臓の長手軸方向に沿って心底から心尖まで、一連の5mm厚切片を調製し、その後、標準的組織学のために処理した(図15および17に示されるように、筋肉の可視化のためのヘマトキシリンおよびエオシン染色、およびコラーゲン含量を評価するためのマッソン-トリクローム染色を行った)。

【0299】

(結果)

(心機能に対する筋芽細胞移植の効果)

実験により、手術の24時間以内に、心筋梗塞は20%未満の急性死亡率を生じた。一方、この細胞移植手順は、さらなる動物の死亡を引き起こさなかった。

【0300】

心室リモデリングは、全体的な心腔の拡大と心力不全とを特徴的に生じる。術後2週目。4週目および8週目において、組織(MS群)およびMI群は、左心室直径の有意な減少を生じ、左心室拡張末期面積(LVEDA)および左心室収縮末期面積(LVESA)の両方が、この処置後に改善した。さらに筋芽細胞シート群における駆出率(EF)値および内径短縮率(FS)値もまた、MI群と比較した高かった(図19を参照)。

【0301】

細胞治療を行っていないコントロール群の心臓は、心室のさらなる拡張、前壁の肥厚、および明らかに低い駆出率 (EF) 値および内径短縮率 (FS) 値を示した。

【0302】

(組織学的知見)

MI 群の損傷心臓が、拡張して不均一に厚くなった壁を有したこと (図 20 を参照)、および移植細胞のパッチをほとんど含まなかったことが、組織学によって明らかになった (図 21)。対照的に、シート移植体を含む梗塞心臓は、拡張せず、均一に厚くなった壁を有し、十分に細胞化し、そして瘢痕を有さなかった。移植体の生存を、移植後 2 週間目、4 週間目、および 8 週間目に同定した。

【0303】

移植細胞の技術的な損失は、Y 染色体の存在について RT-PCR によって分析した場合、15 分および 1 日の時点で、MS 群においては MI 群と比較して少なかった (全心臓細胞数の $3.7 \pm 0.5\%$ 対 $1.7 \pm 0.5\%$)。

【0304】

(連続写真)

本発明の筋芽細胞移植によって、実際に拍動が生じていることを動画を撮影することによって確認した (図 22 ~ 29)。

【0305】

図 22 は、電気生理学的試験の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。A ~ C は、コントロールであり、D ~ F は、本発明の筋芽細胞シートによる結果である。

【0306】

図 23 は、GFAP の発現の様子を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。本発明の筋芽細胞シートは、実際に拍動していることがわかる。

【0307】

図 24 は、本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【0308】

図 25 もまた、超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。示されるように、本発明によって、梗塞がほぼ治癒し、ほぼ正常に拍動している様子がわかる。

【0309】

図 26 ~ 28 は、別の時点での図 25 とおなじサンプルを示した写真である。このように、梗塞心は本発明によってほぼ治癒している様子がわかる。

【0310】

図 29 もまた、本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。このように、梗塞が本発明の処置により治癒していることがわかる。

【0311】

(結論)

骨格筋芽細胞移植は、心臓リモデリングを減弱させそして損傷心筋層を再生させることによって、細胞移植と比較して、全体的心機能を改善した。このことは、心筋再生治療のための有望なストラテジーを示唆する。

【0312】

従って、筋芽細胞シートを三次元構造体として用いて移植した場合に、障害心筋層の心機能が改善することを実証した。本実施例では、直接注入を使用して、自己由来骨格筋芽細胞 (SM) の移植を、臨床適用した。直接注入に起因する移植細胞および移植細胞外基質 (ECM) の損失は、骨格筋芽細胞の数および能力を制限するからである。

【0313】

自己由来細胞供給源を使用する臨床試験に関して、自己由来筋芽細胞が好ましい。細胞移植よりも組織移植の方が、損傷心臓を再生するために有利であることも実証された。

【0314】

(実施例3: 骨格筋芽細胞-組織操作した筋芽細胞シートの移植は、心筋症ハムスターにおいて、心臓リモデリングの減弱によって心機能を改善する)

次に、骨格筋芽細胞を用いて作製した人工組織または三次元構造体が心筋症が改善するかどうかを実証した。

【0315】

細胞治療は、虚血性心筋症についての有望な戦略である。しかし、直接注入法は、DCMにおける全般的細胞送達について制限を有するようである。この一連の証拠を考慮して、組織操作した筋芽細胞シートは、拡張型心筋症(DCM)における心機能を改善するための優れた有望な方法であり得ると、本発明者らは考え本実施例を実行した。

【0316】

(方法)

中程度の心臓リモデリングを示す27週齢の雄性BIO TO-2 (拡張型心筋症モデルマウス(DCM))を、レシピエントとして使用した。BIO FIBハムスター(FIB)から単離した筋芽細胞を、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド製温度応答性高分子をグラフティングした皿上で培養し、そして20℃にて、酵素処理を用いることなく細胞シートを脱着した。

【0317】

以下の3つの異なる治療: (1) 筋芽細胞シート移植群(S群、n=8)、(2) 筋芽細胞(FIBから単離した筋芽細胞)注入群(T群、n=10)、(3) シャム手術群(C群、n=10)を行った。S群において、筋芽細胞シートを、左心室(LV)壁上に移植した。T群において、筋芽細胞を、右心室(RV)壁および左心室(LV)壁中に注入した。

【0318】

(結果)

(梗塞心筋層の機能的回復)

Bモード分析により、C群と比較してT群において、左心室の拡張が十分に抑制されたこと、および全体的壁運動が十分に保存されたことが、示された(図18)。

【0319】

筋芽細胞シートを移植した後、拡張した左心室(LV)寸法が顕著に減少したことが、超音波エコー図(UCG)によって示された(図33)。一方、T群およびC群の心臓は、左心室(LV)拡張の進行を示した。手術の6週間後、内径短縮率(FS)は、C群と比較して、S群およびT群において有意に改善された。7週間後、S群における内径短縮率(FS)は手術前のレベルで維持され、一方、他の群の内径短縮率(FS)は、徐々に減少した。S群における僧帽弁E波の最大速度は、シート移植の1週間後にわずかに減少したが、これは、手術の2週間後に、手術前のレベルに回復した。S群およびT群における平均E波は、手術の4週間後およびその後、C群においてよりも有意に高かった。移植したシートがほぼ全心臓を覆うこと、および生存筋芽細胞により左心室(LV)壁厚が増加したことが、S群における組織学的検査によって示された(図30~33)。

【0320】

(結論)

筋芽細胞シート移植は、拡張型心筋症(DCM)心臓において、心臓拡張の進行を減少させ、心機能を改善した。筋芽細胞シート移植は、拡張型心筋症(DCM)心臓における心臓リモデリングの減弱により心機能を回復させるための有望な方法であり得る。

【0321】

(実施例4: プタ梗塞モデルにおける治療)

本実施例では、より臨床での知見をめざし大動物心筋梗塞モデルに骨格筋芽細胞シート

を移植し、その心機能改善を検討した。

【0322】

(方法)

30kgのブタを全身麻酔下、開胸を行い、LADを結紮することにより作成された心筋梗塞モデルに3つの異なる治療1) 骨格筋芽細胞シート群2) 骨格筋芽細胞注入群3) コントロール群を作成し、心機能、心筋組織の変化を検討した(図34)。骨格筋芽細胞は自己の大腿筋から採取し、分解液としてコラゲナーゼ、トリプシンEDTA、硫酸ゲンタマイシン、アンフォテリシンBを調製後、0.22 μ フィルターでろ過したものを使用し、初代培養液としてSkBMBasal Medium、ウシ胎児血清、EGF、リン酸デキサメタゾンナトリウム、硫酸ゲンタマイシン、アンフォテリシンBを調製後0.22 μ フィルターでろ過したものを使用した。この細胞をポリ(N-イソプロピルアミド製温度応答性高分子をグラフトした皿上で培養し、温度変化にて酵素処理することなく細胞シートを脱着した。

【0323】

(結果)

細胞シートを移植した群では心機能の収縮性、拡張性が改善している(図35および36)。さらに心筋梗塞部分に移植細胞の生着を確認した。

【0324】

(結論)

げっ歯類以外の動物の実験においても、本発明の筋芽細胞シートを使用して治療することにより心機能改善効果が認められた。

【0325】

(実施例5: 滑膜細胞)

別の細胞で実証するために、組織幹を含む細胞として、滑膜細胞をシート状にし、心筋梗塞モデルに移植し、心機能改善効果があるか検討した。

【0326】

(方法)

8週齢ラットの膝関節を剥離し、関節内側面に滑膜組織を切離する。20%FBS、DMEMhighglucoseの培養液に貼り付け、細胞を培養する。得られた細胞をポリ(N-イソプロピルアミド製温度応答性高分子をグラフトした皿上で培養し、温度変化にて酵素処理することなく細胞シートを脱着した。LADの結紮することにより作成された心筋梗塞モデルに3つの異なる治療1) 細胞シート群2) 細胞注入群3) コントロール群を作成し、心機能、心筋組織の変化を検討した。

【0327】

(結果)

細胞シートを移植した群では心機能の収縮性、拡張性が改善している。さらに心筋梗塞部分に移植細胞の生着を確認した。

【0328】

(結論)

滑膜組織から得られた細胞から分化した細胞においても、シート化することにより心機能改善効果が認められる。

【0329】

(実施例6: 幹細胞)

未分化細胞の例として、マウス胚性幹細胞から心筋細胞に分化する細胞があることが知られている。今回、この心筋細胞をシート状にし、心筋梗塞モデルに移植し、心機能改善効果があるか検討した。

【0330】

(方法)

マウス胚性幹細胞のうちMHCの発現する遺伝子のプロモーターの部位に耐性遺伝子を導入し、分化させると心筋細胞以外に分化する細胞は淘汰される高濃度薬剤選択性培養を行い、心筋細胞を選択した。この細胞をポリ(N-イソプロピルアミド製温度応答性高分子

をグラフトした皿上で培養し、温度変化にて酵素処理することなく細胞シートを脱着した。LADの結紮することにより作成された心筋梗塞モデルに3つの異なる治療1) 細胞シート群2) 細胞注入群3) コントロール群を作成し、心機能、心筋組織の変化を検討した。

【0331】

(結果)

細胞シートを移植した群では心機能の収縮性、拡張性が改善している。さらに心筋梗塞部分に移植細胞の生着を確認した。

【0332】

(結論)

胚性幹細胞から分化した細胞においても、シート化することにより心機能改善効果が認められる。

【0333】

(実施例7: アスコルビン酸添加による人工組織作製)

次に、アスコルビン酸またはその誘導体による人工組織作製への影響を検討した。

【0334】

筋芽細胞を十分量増殖させた後、 5×10^6 の細胞数を、10cmの温度応答性培養皿にて培養した。培養には、SkBM Basal Medium (Clonetics (Cambrex)) という培地を使用した。次に、アスコルビン酸2リン酸 (0.5mM)、アスコルビン酸1リン酸マグネシウム塩 (0.1mM)、L-アスコルビン酸Na (0.1mM) を投与し、培養開始4日後に20度にて、脱着させた。コントロールとして、アスコルビン酸類を添加しない培養系で培養した人工組織を作製した。

【0335】

(結果)

アスコルビン酸類を添加した場合は、無添加の培養系での人工組織よりも、脱着が格段に容易となっており、しかも、無添加の培養系では、数mm程度の大きさまでしか培養されず、それを超えると、割れ目などが入り、成長しなかった。しかも、はがすことが実質的に困難であり、移植可能な人工組織を提供できなかった。これに対し、本発明のアスコルビン酸類を添加した培地で培養した人工組織は、移植可能な程度の大きさに成長し、しかも、脱着が容易であり、孔も発生せず、傷もほとんど付けることなく人工組織を単離することができた。生物学的結合を見たところ、細胞外マトリクスによる相互作用がかなり進んでいることが判明した (図36~38)。

【0336】

(実施例8: アスコルビン酸2リン酸添加の効果)

次に、アスコルビン酸2リン酸による人工組織作製への影響を検討した。

【0337】

滑膜細胞および筋芽細胞を十分量増殖させた後、 5×10^6 の細胞数を、10cmの温度応答性培養皿にて培養した。培養には、アスコルビン酸2リン酸 (1mM) を含むSkBM Basal Medium (筋芽細胞) またはアスコルビン酸2リン酸 (1mM) を含むDMEM (滑膜細胞) という培地を使用した。コントロールとして、アスコルビン酸類を添加しない同じ培地を含む培養系および通常使用されるアスコルビン酸1リン酸 (1mM) を含む同じ培地を含む培養系で培養した人工組織を作製した。

【0338】

培養開始9日後に、脱着させ、収縮させた。収縮させるとおよそ3分の1程度に収縮した。

【0339】

収縮した組織をHE染色などの組織学分析を行ったところ (図42、滑膜細胞)、細胞は10層以上になり、マトリクスはコラーゲンのメッシュまたはスポンジ状となっており、ピンセットで容易につまめる硬さとなっていた。

【0340】

(応力-歪み試験 (引っ張り試験))

強度を確かめるために、引っ張り試験により、物体を引っ張ったときの荷重-時間（応力歪み）曲線を得る。この曲線から比例限度、弾性係数、降伏点、最大強さ、破断点、弾性エネルギーおよび靱性を得る。

【0341】

（クリープ特性（インデンテーションテスト））

クリープ特性を測定するインデンテーション試験は、粘弾性を測定することによって実施する。歪みが増加する現象を観察することができる。棒のようなものでゲル状物質を一定圧で押し込み、変形をモニターする。

【0342】

（結果）

アスコルビン酸2リン酸を添加した場合は、無添加の培養系での人工組織および通常使用されるアスコルビン酸1リン酸を含む系での人工組織よりも、脱着が格段に容易となっており、しかも、無添加の培養系では、数mm程度の大きさまでしか培養されず、それを超えると、割れ目などが入り、成長しなかった。通常使用されるアスコルビン酸1リン酸を含む系で培養したものも、大きさ、強度などの点で添加した系に及ばなかった。無添加コントロール系では、人工組織をはがすことが実質的に困難であり、移植可能な人工組織を提供できなかった。

【0343】

特に、硬度という点では、アスコルビン酸2リン酸を含む系で培養した人工組織は、ピセットでつまめる程度の硬度であったのに対して、それ以外のものでは、硬度の点でアスコルビン酸2リン酸を含む系には及ばなかった。アスコルビン酸2リン酸を添加した培地で培養した人工組織は、移植可能な程度の大きさに成長し、しかも、脱着には特別な注意も要することなく、孔も発生せず、傷もほとんど付けることなく人工組織を単離することができる。生物学的結合を見たところ、細胞外マトリクスによる相互作用がかなり進んでいることが判明した。

【0344】

（実施例9：アスコルビン酸類の存在下で培養した人工組織の効果）

実施例7および8においてアスコルビン酸類の存在下で作製した人工組織を、拡張型心筋症マウスに移植したところ、移植したマウスすべてが完治し、通常のマウスと同様の生存期間生存した。従って、本発明は、特定の三次元化促進因子の存在によって、従来難治性といわれた疾患をも完治させることができることが判明した。

【0345】

（実施例10：併用療法）

上記実施例で作成されたシートと遺伝子治療の併用療法を施行した。これは併用療法によりシート移植部の血管新生を促進し、移植シートの生着促進、シート内部の細胞壊死を抑制する目的である。

【0346】

（方法）

センダイウイルス（HVJ）およびリポソーム複合体の調製は文献（Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Increased expression of DNAdo-introduced with nuclear protein in adult rat liver. Science.1989;243:375-378）の記載に従っておこなった。以下に簡潔に示す。DNA溶液200 μ lを加え、30秒間振盪し、37度恒温槽に30秒間静置する。これを8回繰り返す。5秒間超音波処理をし、30秒間振盪する。0.3mlのBSSを加え、37度恒温槽で振盪する。不活化したHVJを加え、氷上で10分間置く。37度恒温槽にて1時間振盪する。超遠心チューブに60%と30%のショ糖溶液をそれぞれ1ml、6mlで重層し、HVJリポソーム液をのせ、BSSをチューブの付近まで加える。62,800g、4度で1.5時間超遠心する。30%ショ糖溶液層のすぐ上を回収し、4度に保存し、遺伝子導入に用いた。

【0347】

約0.2mlのセンダイウイルスリポソームプラスミド複合体（15 μ gのヒトHGF cDNAを含む）を心筋梗塞領域に注射した。コントロール群に対しては、空のベク

ターを梗塞を起こした心筋に遺伝子導入した。心臓組織におけるヒトHGF濃度を、抗ヒトHGFモノクローナル抗体（日本、東京、株式会社特殊免疫研究所（Institute of Immunology））を用いて酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）で測定した（Ueda H, Sawa Y, Matsumoto K et al. Gene Transfection of Hepatocyte Growth Factor Attenuates reperfusion Injury in the Heart. Ann Thorac Surg. 1999;67:1726-1731）。細胞をポリ（N-イソプロピルアミド製温度応答性高分子をグラフトした皿上で培養し、温度変化にて酵素処理することなく細胞シートを脱着した。LADの結紮することにより作成された心筋梗塞モデルに3つの異なる治療1）細胞シート群2）遺伝子治療群3）併用療法群4）コントロール群を作成し、心機能、心筋組織の変化を検討した。

【0348】

（結果）

細胞シートを移植した群、併用療法群では心機能の収縮性、拡張性が改善している。さらに併用療法をした群では心筋梗塞部分に血管新生を認め、移植細胞の生着が改善していることが確認できる。

【0349】

（結論）

シート化した組織と遺伝子治療とを併用することにより心機能改善効果とさらに血管新生効果と細胞保護効果があり、より心機能の改善が認められる。

【0350】

（実施例11：滑膜細胞）

次に、種々の滑膜細胞を用いて、人工組織を作製した。以下に説明する。

【0351】

<細胞の準備>

ブタ（LWD三元交配種、細胞接種時には2～3月齢のものを使用）膝関節より滑膜細胞を採取し、コラゲナーゼ処理後、10%FBS-DMEM培地（HyCloneから入手可能、DMEMはGIBCOから入手したものを使用）にて培養および継代を行った。継代数について、滑膜細胞においては10継代にても多分化能を有するという報告もあることから、本実施例においては最大10継代まで使用したが、用途に応じてそれ以上の継代細胞も用いることが理解される。実際に人体に移植する場合には自家移植であるが、十分な細胞数の確保しつつ、感染等の危険性を軽減するために培養期間の短縮する必要がある。

【0352】

これらを考慮して、種々の継代細胞を用いた。実際に行った細胞は、初代培養細胞、1継代、2継代、3継代、4継代、5継代、6継代、8継代、10継代のものを実験した。これらを用いて、人工組織を用いた。

【0353】

<人工組織の作製>

35mm皿、60mm皿または100mm皿（BD Biosciences、セルカルチャー皿・マルチウェルセルカルチャープレート）の上に 4.0×10^6 個の滑膜細胞を2mlの10%FBS-DMEM培地にまきこんで培養した。その際にアスコルビン酸を添加した。皿、アスコルビン酸及び細胞の濃度は、以下のとおりである。

皿：BD Biosciences、セルカルチャー皿・マルチウェルセルカルチャープレート

アスコルビン酸 2リン酸：0 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM、および5 mM

アスコルビン酸 1リン酸：0 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM、および2 mM

細胞数： 1×10^5 細胞/cm²、 2.5×10^5 細胞/cm²、 4.0×10^5 細胞/cm²、 5×10^5 細胞/cm²、 7.5×10^5 細胞/cm²、 1×10^6 細胞/cm²、 5×10^6 細胞/cm²、および 1×10^7 細胞/cm²

予定培養期間まで、2回/週で培地交換を行った。培養期間に達したら、皿周囲を全周

性に100 μ lのピペットマンでピペッティングを行いながら、細胞シートとディッシュを分離した。分離できたら皿を軽く揺することにより細胞シートを可能な限り平坦にした。その後培地を1ml追加し、細胞シートを完全に浮遊させ、2時間放置することにより細胞シートが収縮をおこし、3次元化することにより人工組織を作製した。この作製模式図を図43に示す。温度感受性培養皿は表面がポリアクリルアミドという樹脂にてコーティングすることにより、温度変化により表面の親水性を変えることができる。温度を37度から32度以下に変化させると、表面が疎水性から親水性となり、培養細胞及び細胞外マトリックスが一塊となり細胞皿から遊離する。この技術の最大の利点は、細胞と、細胞に生成させたマトリックスの複合体という形で細胞移植が可能であるので外部の素材を必要としないことである。さらに、マトリックス表面にある細胞接着因子を温存したまま移植できるので、移植片とドナー側を生物学的に接着させることが可能である。本実施例では、この技術を骨軟骨、筋肉といった整形外科の分野へ応用した。

【0354】

その結果の一例を、図44に示す。図44左に示されるように、滑膜細胞を用いた場合でも、孔のない大きな組織が作製された。この組織は、図44右に示すように、厚みがあり、細胞外マトリックスに富んでいるようであることが明らかになった。

【0355】

これが機械的にはがし、収縮を生じさせた人工組織の図である。人工組織はシート状で作製され、皿から剥がした後にそのまま放置すると、シートが収縮を起こし、約半分の大きさになる。組織でみると、単層に比べ、非常にマトリクスリッチであり、その間に細胞が幾層にもわたり点在して重層化しているのがわかる。温度感受性の培養皿は、用いても用いなくてもこのような人工組織を作製することが本実施例で示された。その場合、温度を変化させなくてもコンフルエントとなった状態で、接着部にせん断ストレスを加えることによって再現性良くこの人工組織を作製することが可能である。

【0356】

次に細胞外マトリクスを含む種々のマーカーを染色した。

【0357】

<マッソントリクローム染色>

マッソントリクローム染色法は以下のとおりである：マッソントリクローム染色では、鉄ヘマトキシリンで核が染められ、その後に拡散速度の大きい小色素分子（酸フクシン、ボンソーキシリジン）が細胞の細網孔へ浸透し、次いで拡散速度の小さい大色素分子（アニリン青）が膠原線維の粗構造に入り込み青色に染め出す。

【0358】

マッソントリクローム染色で使用する試薬

A) 媒染剤

10%トリクロル酢酸水溶液	1容
10%重クロム酸カリウム水溶液	1容

B) ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液（使用時に1液と2液を等量混合）

1液

ヘマトキシリン	1g
100%エタノール	100ml

2液

塩化第二鉄	2.0g
塩酸（25%）	1ml
蒸留水	95ml

C) 1%塩酸70%アルコール

D) I 液

1%ビーブリッヒスカーレット	90ml
1%酸性フクシン	10ml

酢酸 1ml

E) II液

リンモリブデン酸 5g
リントングステン酸 5g
蒸留水 200ml

F) III液

アニリン青 2.5g
酢酸 2ml
蒸留水 100ml

G) 1%酢酸水

マッソントリクローム染色法の手順

1. 脱パラ、水洗、蒸留水
2. 媒染 (10~15分)
3. 水洗 (5分)
4. ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液 (5分)
5. 軽く水洗
6. 1%塩酸70%アルコールで分別
7. 色出し、水洗 (10分)
8. 蒸留水
9. I 液 (2~5分)
10. 軽く水洗
11. II液 (30分以上)
12. 軽く水洗
13. III液 (5分)
14. 軽く水洗
15. 1%酢酸水 (5分)
16. 水洗 (すばやく)
17. 脱水、透徹、封入。

【0359】

マッソントリクローム染色法では、膠原線維、細網線維、糸球体基底膜は、鮮やかな青に染まり、核は黒紫色に染まり、細胞質は淡赤色に染まり、赤血球は橙黄色~深紅色に染まり、粘液は青色に染まり、細胞分泌顆粒は好塩基性が青に好酸性が赤に染まり、線維素は赤に染まる。従って、青く染まった面積を線維化した部位として算出することができる。

。

【0360】

＜ヘマトキシリン・エオジン (H E) 染色＞

細胞における支持体の定着・消長を観察するために、H E 染色を行った。その手順は以下のとおりである。必要に応じて脱パラフィン (例えば、純エタノールにて)、水洗を行い、オムニのヘマトキシリンでサンプルを10分浸した。その後流水水洗し、アンモニア水で色出しを30秒間行った。その後、流水水洗を5分間行い、塩酸エオジン10倍希釈液で2分間染色し、脱水し、透徹し、封入する。

【0361】

(各種細胞外マトリクス)

- 1) 凍結ストックから、5 μ m 厚の切片を作製する。

【0362】

- 2) -20℃で5-10分間にわたり、アセトン中でこの切片を固定する (パラフィンブロックは、パラフィン除去し再水和する必要がある)
- 3) 内因性ペルオキシド活性は、メタノール中0.3% H₂O₂ 中で20分間室温でブロックする (1ml 30% H₂O₂ + 99ml メタノール)
- 4) P B S で洗浄する (3×5分)。

【0363】

5) モノクローナル一次抗体 (各種細胞外マトリクスに対するマウスまたはウサギ抗体) (1 μ l 抗体 + 200 μ l PBS / スライド) と 4℃ で湿式チャンバー内で一晚インキュベートする。

【0364】

6) 翌日 PBS で洗浄する (3 × 5 分)。

【0365】

7) 抗マウスおよび抗ウサギの no. 1 ビオチン化結合を、30 分 - 1 時間室温で適用する (3 滴を直接スライドにたらし)。

【0366】

8) PBS で洗浄する (3 × 5 分)。

【0367】

9) ストレプトアビジン HRP no. 2 を、LSAB についてたらし 10 15 分間浸す。

【0368】

10) PBS で洗浄する (3 × 5 分)。

【0369】

11) DAB をたらし (5 ml DAB + 5 μ l H₂O₂)

12) 茶っぽい色を顕微鏡で観察する。

【0370】

13) 水中に 5 分ほど浸す。

【0371】

14) HE を 30 秒 - 1 分間浸す。

【0372】

15) 数回洗浄する。

【0373】

16) イオン交換水で 1 回洗浄する。

【0374】

17) 80% エタノールで 1 分洗浄する。

【0375】

18) 90% エタノールで 1 分洗浄する。

【0376】

19) 100% エタノールで 1 分洗浄する。(3 回)

20) キシレンで 3 回 × 1 分間洗浄する。その後カバースリップをかける。

【0377】

21) 発色を見る。

【0378】

細胞外マトリクス染色の結果を図 45 に示すように、種々の細胞外マトリクス (コラーゲン I 型、II 型、III 型、IV 型、フィブロネクチン、ビトロネクチンなど) があることがわかる。免疫染色をしたところ、コラーゲン I および III は強く染色されたが、コラーゲン II はあまり染色されない。強拡大みると、赤く染色されているのは核であるが、コラーゲンは、核から少し離れた部位で染色されており、細胞外マトリックスであることが確認できる。一方、細胞接着因子として重要とされているフィブロネクチン、ビトロネクチンについても染色を認め、特に人工組織の辺縁に強く染色された。強拡大みると、コラーゲンとは異なり、核に密接するように染色されており、細胞周囲およびにも存在することが確認できる。

【0379】

これらの結果から、人工組織の作製には、少なくとも 4 ~ 5 継代ある方が好ましいことが明らかになった。

【0380】

(実施例 12: 力学的特性の測定)

次に、本発明の人工組織の力学的特性を測定した。そのプロトコルを以下に示す。

【0381】

まず、力学的特性を、引っ張り試験により試験した。

【0382】

実験装置の外観を図 46 および図 47 に示す。図 47 は、裸の状態試験片把持部を示す。この装置に示すように、人工組織の両端を試験片把持部に保持させる。人工組織には、測定が簡単のようにマーカーを付す。図 48 に、マーカーが付された様子を示す。図 49 には、試験片把持部の拡大図を示す。図 50 に、人工組織の破断実験後の様子を示す。

【0383】

人工組織を図のようにはさみ、マーカーをおいて引張試験を行う。最大荷重が 1.89 N、ヤング率 19.2 メガパスカルであった。参考として、最大張力は、通常、皮膚が最大荷重は軟骨で 0.7 から 1.2 皮膚で 1.1 です。ヤング率は軟骨が 10 MPa 皮膚が 35 MPa です。このように、本発明の人工組織は、十分に外科的にハンドリングに耐えうるものであることが明らかになった。

【0384】

実験結果を図 51 および図 52 に示す。示される結果から、最大荷重は、それぞれ、1.89 N、1.9 N であることが明らかになった。ヤング率 (接線係数) は、19.2 MPa であることが明らかになった。

【0385】

(実施例 13: 自己支持性の判定)

次に、自己支持性の判定実験を行った。ピンセットとして、先曲がり先細無鉤ピンセット A-11 (ステンレス製、全長 120 mm、先曲がり 20 mm、先端は 0.1 mm のもの; 夏目製作所) を用いて人工組織を挟み、図 53 に示すような様式を用いて試験した。バラバラになるかならないかは、目視により判断した。片が複数になったものはバラバラになったと判断した。この判定は、他のピンセット、例えば、別の種類のピンセットとして先曲がり先細無鉤ピンセット A-12-2 (ステンレス製・ボッチ付、全長 100 mm、先端は 0.05 mm のもの; 夏目製作所) を用いて別の実験者が行った場合でも、同様の結果が見出された。

【0386】

自己支持性の判断は、人工組織の剥離時および剥離後に保存した後のものを試験することができる。

【0387】

上記実施例などに記載されるように、心筋細胞、筋芽細胞、滑膜細胞について、アスコルビン酸を含む三次元化促進因子の存在下で作製した人工組織はいずれも、バラバラにならなかった。これに対して、このような因子の非存在下で作製した人工組織は、剥離時にすでにバラバラになったことから、自己支持性が全くないことが確認された。

【0388】

従って、1) 周囲のピペッティングの際に簡単に剥がれるかどうか; および 2) はがれたシートの辺縁を軽くさわるだけで、さらにシートが簡単にはれるかどうかというこの 2 点さえクリアできれば、あとは自然に拘縮するので十分な強度になるようであることが判明した。

【0389】

従って、自己支持性は、本発明の方法によって初めて獲得された性質であるといえる。

【0390】

(実施例 14: 骨分化誘導)

本実施例では、骨分化誘導を行った場合でも本発明の人工組織が機能するかどうかを確認した。

【0391】

骨化誘導等、人工組織なにか改変を加える際について、浮遊した状態のまま何らかの刺

激を加えても人工組織の収縮が進行するのみであるため、人工組織と皿とが再接着させる必要がある。人工組織を培養 7 日間にて作製した後、人工組織が浸る程度まで培地を吸引し一日間放置することにより、人工組織と皿とが再接着させることが可能である。

【0392】

まず、はじめから骨化誘導培地 (10% FBS-DMEM+10 μ M デキサメタゾン、10mM グリセロホスフェート、0.2mM アスコルビン酸 2 リン酸) にて培養し、骨化誘導させた滑膜細胞によって、本発明の人工組織が作製できることを確認した。

【0393】

次に、再接着させた人工組織に対して、培地を骨化誘導培地として培養することにより、人工組織に石灰沈着骨が生じることを確認した。その結果を、図 53 に示す。

【0394】

人工組織そのものを同様に骨形成への分化誘導をかけた。外見上もコントロールが透明なのに比べ、骨形成した人工組織は白色です。アリザリンレッド (Alizarin Red) には強く染色され、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色もコントロールに比べ強く染色されている。このように、滑膜細胞による人工組織が骨分化能を有することが確認できる。

【0395】

(実施例 15: 軟骨修復)

次に、軟骨修復が可能であるかどうかを確認した。

【0396】

人工組織の接着能の有無を確認するため、豚軟骨片上に同種の人工組織を移植した。人工組織は、細胞数 4.0 $\times 10^6$ 個/35mm 皿、アスコルビン酸 1 mM、培養期間 7~14 日間という条件で作製した。軟骨片に径 6 mm の創を作成し、上層帯をメスにて切除し、コンドロイチナーゼ ABC (1 U/1ml) を添加し、5 分間処理した。人工組織を径 6 mm となるように採型・移植し、7 日間培養した。

【0397】

次に、豚軟骨移植を施行した。上記同様、生体の大腿骨内果部に径 6 mm の創を作成し、上層帯をメスにて切除し、コンドロイチナーゼ ABC (1 U/1ml) を添加し、5 分間処理した後に同種人工組織を径 6 mm となるように採型・移植し、10 日間飼育した。その結果を、図 54 および図 55 に示す。図 56 には、本発明の人工組織と軟骨マトリクスとが直接癒合している様子を示す。図 56 左には、HE 染色の様子を示し、中には抗フィブロネクチン抗体で染色した写真を示し、図 56 右には、抗ビトロネクチン抗体で染色した写真を示す。図 56 から明らかなように、矢印で示すように、細胞を介した接着ではなく、人工組織のマトリクスと軟骨のマトリクスとが直接接着していることが明らかになった。接着面はフィブロネクチンおよびビトロネクチンが集積していることがわかる。つまりこれら接着因子が人工組織と被移植組織の接着に関与していることが示唆される。従って、本発明は、従来の人工組織、あるいは細胞よりも、天然での癒合が顕著であるという点でも特徴的であることがわかる。

【0398】

図 54 では、接着能を保持しているかをみるために、豚軟骨片上に人工組織を移植し器官培養を行いました。軟骨片の表在性帯 (superficial zone) をメスにてそいだ後にコンドロイチナーゼ ABC にて処理した後に人工組織を移植し、7 日間培養した。7 日間培養後の組織ですが、図のように生物学的に接着することが確認できた。

このように、本発明の人工組織は、心臓、骨のみならず、軟骨でも機能することが明らかになった。

【0399】

(実施例 16: 半月修復)

次に、本発明の人工組織が半月修復においても使用可能かどうかを確認した。

【0400】

上記実施例 14 同様、同種の人工組織を、細胞数 4.0 $\times 10^6$ 個/35mm 皿、アスコルビン酸 2 リン酸 1 mM、培養期間 7~14 日間という条件で作製した。半月に径 5.5 mm の欠損を

作成した後に、人工組織を移植した。人工組織が生着するまでの保護として、コラーゲンシート（ニプロ（株））を用いて欠損部を被覆し、1ヶ月後間飼育した。その結果を図57～図61に示す。示されるように、半月が修復されていることが明らかになった。

【0401】

（実施例17：コラーゲン産生の測定）

次に、本発明の人工組織の移植により、細胞外マトリクスであるコラーゲンが十分賛成されているかどうかを確認した。以下のプロトコールを使用した。

【0402】

<方法>

培養期間：3日、7日、14日、21日、28日

アスコルビン酸2リン酸の濃度：0mM、0.1mM、1mM、5mMで

の条件を用いて、滑膜由来人工組織を作製した。

【0403】

この人工組織の培養液に、6N HClを加え、105度で18時間加水分解し、クロラミンTにて酸化後、Ehrlich's Reagent Solution（p-ジメチルアミノベンズアルデヒド2g+60%過塩素酸3ml；イソプロパノールを3：13になるように希釈して作製）にて発色させ吸光度を測定した。

【0404】

<結果>

1) コラーゲン産生量について、アスコルビン酸については、 $0\text{mM} \ll 5\text{mM} < 1\text{mM} \leq 0.1\text{mM}$ であった。コラーゲン産生という観点においては、至適濃度は0.1～1mMであった。この骨化誘導培地の条件は、アスコルビン酸2リン酸0.2mMであることから、骨化誘導は、本発明のアスコルビン酸が自己支持性を付与するに適切な濃度の範囲内で起こり得ることが明らかになった。

【0405】

2) 培養期間についてみると、コラーゲン産生という観点においては、時間依存的にコラーゲン産生量が増加していることが明らかになった。

【0406】

（実施例18：アスコルビン酸の好ましい濃度）

次に、細胞密度およびアスコルビン酸の好ましい濃度を、探るべく、種々の濃度での人工組織の作製を試みた。

【0407】

実施例1において、皿、アスコルビン酸及び細胞の濃度は、以下のとおりに変化させてその影響を観察した。

皿：温度応答性高分子ポリイソプロピルアクリルアミド（PIPAAmグラフティングポリスチレン細胞培養皿）

アスコルビン酸2リン酸：0mM、0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、および5mM

アスコルビン酸1リン酸：0mM、0.1mM、0.5mM、1mM、および2mM

細胞数： 1×10^5 細胞/cm²、 2.5×10^5 細胞/cm²、 4.0×10^5 細胞/cm²、 5×10^5 細胞/cm²、 7.5×10^5 細胞/cm²、 1×10^6 細胞/cm²、 5×10^6 細胞/cm²、および 1×10^7 細胞/cm²

このうち、細胞数 5×10^5 細胞/cm²について、アスコルビン酸なし；アスコルビン酸1リン酸0.1mMおよびアスコルビン酸2リン酸0.5mMならびにアスコルビン酸1リン酸1.0mMおよびアスコルビン酸2リン酸5.0mMの3通りの培養液について、自己支持性を評価した。その結果、いずれの濃度でも、薄いシートではがれたりはがれなかったりする傾向が見られた。アスコルビン酸を加えたものでは、破れはないものが観察された。次に、細胞数 1×10^6 細胞/cm²について、アスコルビン酸なし；アスコルビン酸1リン酸0.1mMおよびアスコルビン酸2リン酸0.5mM；ならびにアスコルビン酸1リン酸1.0mMおよびアスコルビン酸2リン酸5.0mMの3通りの培

養液について、自己支持性を評価した。アスコルビン酸を加えないものは、シートにならなかったが、加えたものは、いずれも厚い人工組織が形成された。特に、アスコルビン酸 1 リン酸 0.1 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 0.5 mM では、細胞外マトリクスに隙間がある人工組織が作製されたのに対して、アスコルビン酸 1 リン酸 1.0 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 5.0 mM では、細胞外マトリクスがぎっしり詰まった人工組織が作製されることが明らかになった。

【0408】

次に、細胞数 5.0×10^6 細胞/cm² について、アスコルビン酸なし；アスコルビン酸 1 リン酸 0.1 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 0.5 mM；ならびにアスコルビン酸 1 リン酸 1.0 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 5.0 mM の 3 通りの培養液について、自己支持性を評価した。この場合、いずれも薄いシートが形成されるものの、剥がす際に剥がれることが明らかになった。

【0409】

これらの結果を図 6 2 に示す。図 A-a は、アスコルビン酸 1 リン酸 1.0 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 5.0 mM で、かつ、細胞密度 1×10^6 細胞/cm² の場合を示し、A-b は、アスコルビン酸 1 リン酸 0.1 mM およびアスコルビン酸 2 リン酸 0.5 mM で、かつ、細胞密度 1×10^6 細胞/cm² の場合を示す。A-a の場合は、ぎっしり厚い人工組織が形成されている。A-b の場合は、細胞外マトリクスに隙間が見えているのがわかる。C で示すのは、シート状にならなかったものの例である。

【0410】

以上の結果は、ブタ筋芽細胞を用いた人工組織に関する実験であったが、ヒトを用いた場合、温度応答性培養皿の高分子量を少なくすると好ましいことも明らかになった。

【0411】

(実施例 19：皿の大きさ、細胞数および継代数の影響)

次に、皿の大きさおよび継代数の影響を調べた。

【0412】

上記実施例 1 の条件を用いて、皿の大きさ (35 mm、65 mm、100 mm) および継代数 (5~7) の細胞を用いて、同様の実験を行った。

【0413】

その結果を図 6 3 および図 6 4 に示す。図 6 3 は、継代数を変化させた場合の人工組織の様子を示し、図 6 4 は、皿の大きさによる変化を示す。このように、どのような皿であっても、継代数であっても、同様に人工組織が形成されることが明らかになった。

【0414】

図 6 3 には、細胞数の相違による人工組織の形成の様子を示す。いずれの場合でも、試験したすべての濃度において人工組織が形成されたことが示される。

【0415】

細胞数については、マトリックス産生という観点からみると、基本的には多い方が良くと考えられるが、多すぎると細胞の収縮力が強くなりすぎて培養開始翌日には自然に剥がれることがわかる。したがって、より大型の人工組織を作製する場合は、比較的薄い濃度で播種することが好ましいようであることが明らかになった。特に、人工組織の強度などをコントロールする場合は、比較的薄い濃度であることが好ましいようである。示されるように、5 継代であれば 5.0×10^5 /cm² では剥がれてしまい、 2.5×10^5 /cm² では自然に剥がれません。6 継代以上でも 7.5×10^5 /cm² では剥がれてしまいましたが、 5.0×10^5 /cm² でははがれなかった。従って、本発明の好ましい人工組織を作製するためには十分数の細胞を確保する必要があり、ある程度の細胞継代が必要であるようである。4 継代のものも試作してみましたが、 4.0×10^5 /cm² では剥がれた。このように、継代数と密接な関係がありそうであり、用途に応じて種々の人工組織を作製することができる。これらの結果から、移植に耐える好ましい細胞としては、5 継代の細胞を 4.0×10^5 /cm² で培養する条件を採用すればよいようであるが、それには限定されないようである。

【0416】

同様に他の細胞でも、細胞濃度により強度を調整することができることが実証される。実施例 1 に記載される条件に基づき、筋芽細胞、実施例 11 に記載される条件に基づき、滑膜細胞、あるいは実施例 21 に記載される条件に基づき脂肪由来細胞に基づき、人工組織を作製し、細胞密度による強度への影響を観察することができる。

【0417】

(実施例 20: 心機能回復例)

次に、実施例 18 において最適化した人工組織を、心臓の機能回復において有用であるかどうかを確認した。心機能の回復の確認試験は、実施例 2 に準じて行った。

【0418】

ここでは、大網を加える実験も行った。大網は、胃に付着する組織取り出し、それを心臓に持ってくることによって実験を行った。

【0419】

結果を図 65 に示す。示されるように、本発明の人工組織を大網と用いることによって、顕著に心臓機能が改善していることが明らかになった。

【0420】

(実施例 21: 脂肪由来組織)

次に、脂肪組織由来の細胞を用いて人工組織を作製した。

【0421】

A) 細胞は、以下のようにして採取した。

【0422】

1) 膝関節の脂肪パッド (f a t - p a d) より検体を採取した。

【0423】

2) この検体を P B S を用いて洗浄した。

【0424】

3) この検体をできるだけ細かく鋏で切り刻んだ。

【0425】

4) コラゲナーゼ (0.1%) 10 ml を加え、37℃水浴にて1時間振盪した。

【0426】

5) DMEM (10% F B S 補充) を同量加えて、70 μ l のフィルター (M i l l i p o r e などから入手可能) に通した。

【0427】

6) フィルターを通った細胞およびフィルターに残った残渣を 10% F B S を補充した DMEM 5 ml に入れて 25 cm² フラスコ (F a l c o n などから入手可能) において培養した。

【0428】

7) フラスコの底面に張り付いた細胞 (間葉系幹細胞を含む) を取り出して以下の人工組織作製に供した。

【0429】

B) 人工組織の作製法

次に、この脂肪由来の細胞を用いて人工組織を作製した。アスコルビン酸 2 リン酸は、0 mM (なし)、0.1 mM、0.5 mM、1.0 mM、5.0 mM の条件を用いた。作製は、上記滑膜細胞を作製した方法 (実施例 11 に記載される) に準じて行った。初期の播種条件としては、 5×10^4 細胞 / cm² を用いた。結果を以下に示す。培養日数は 14 日間を採用した。

【0430】

アスコルビン酸 2 リン酸 0 mM: 接線係数 (ヤング率) 0.28

アスコルビン酸 2 リン酸 1.0 mM: 接線係数 (ヤング率) 1.33

C) 移植実験

次に、この人工組織を実施例 15 (軟骨修復)、実施例 16 (半月修復) に記載されるように、移植実験に供する。その結果、滑膜細胞由来の人工組織と同様に、修復機能を有

することがわかる。

【0431】

(実施例 22：腱・靭帯組織の修復)

腱・靭帯組織を対象とする修復手術を行う。腱・靭帯組織組織の損傷状態を確認し、その際に滑膜細胞を一部採取して、滑膜細胞を培養し、実施例 11 に記載されるようなプロトコールを用いて人工組織を作製する。

【0432】

次に、手術時に、腱・靭帯組織の損傷部位の周囲を切除して、新鮮化した後、上記のように作製した人工組織を配置する。その際、人工組織は接着因子を有することから、縫合する必要なしに癒合する。

【0433】

(実施例 23：骨の修復)

本実施例では、骨の修復実験を行う。実施例 11 に記載されるようなプロトコールを用いて、滑膜細胞を採取および培養し、人工組織を作製する。

【0434】

次に、この人工組織を、シート状のものを骨に適用する。主に骨膜に巻くことによって患部に適用する。その結果、滑膜細胞を用いた人工組織は、骨の修復に効果があることがわかる。

【0435】

(実施例 24：人工組織の形状の多様性)

本実施例では、人工組織の形状による機能の相違を観察する。この実施例では、人工組織をシート状に貼り付ける以外に、丸めて患部に移植しても効果を有し得ることを確認する。このことにより、欠損部の形状等に応じたテイラーメイド手術が可能かどうかを確認する。

【0436】

本実施例では、球状に丸めた形状および線状にした場合、あるいは管状にした場合に移植可能かどうかを調べた。この人工組織は、接着因子を有することから縫合する必要はないことが確認される。

【0437】

以上のように、本発明の好ましい実施形態および実施例を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0438】

本発明は、従来治療が困難であった疾患の根本的な治療方法、技術、医薬、医療デバイスを提供するという有用性を有する。特に、天然に近い状態への回復を促進するという意味において、画期的な治療および予防を提供し、そのために使用される医薬、細胞、組織、組成物、システム、キットなどの提供において本発明は有用であることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0439】

【図 1 A】 本発明の人工組織を温度応答性重合体を用いて作製する例である。

【図 1 B】 本発明の人工組織を温度応答性重合体を用いて作製する別の例である。

【図 2】 本発明の人工組織を用いる治療法と、細胞療法とを比較する例である。

【図 3】 本発明の人工組織を用いる治療スキーム例である。

【図 4】 細胞移植による心筋再生治療の限界を示す。細胞を移植するだけでは、右に示されるに細胞が完全には傷害部位を治癒しない。

【図 5】 足場を用いた組織移植の限界を示す。

【図 6】 本発明の人工組織を用いた梗塞心臓への移植例を示す。

【図 7】移植後の本発明の人工組織の様子を示す。左側は移植後2週間、右側は移植後8週間を示す。左側のパネルの上はH E染色を示し、そのうち左側は100倍、右側は200倍を示す。左側のパネルの下は第VIII因子染色を示し、右側はコネキシン43染色を示す。右側のパネルは、H E染色を示し、上は40倍を示し、下は100倍を示す。

【図 8】本発明の人工組織の心機能評価例を示す。ここでは、超音波エコーの図を示す。左はコントロールであり、右は心筋細胞シートを示す。

【図 9】本発明の人工組織の心機能評価例を示す。ここでは、拍出率 (EF)、拍出率短縮 (FS)、終期収縮期血圧 (ESA)を示す。四角は心筋細胞シートであり、三角はコントロールを示す。左側のパネルの写真は、超音波エコー写真を示す。この写真の上はコントロールであり、下は心筋細胞シートを示す。

【図 10】本発明の人工組織の電気生理学的評価の手法を示す。右側は、電位の変化を示す模式図であり、右側は閾値を数値化したものを示す。右側には、コントロール、本発明の線維芽細胞シートおよび心筋細胞シートを示す。

【図 11】本発明の人工組織の電気生理学的評価を示す。左上は正常心臓、左下は梗塞モデル、右下は心筋細胞シートによる治療を示す。

【図 12】本発明の方法における筋芽細胞の単離および培養法の例である。

【図 13】本発明の方法における筋芽細胞により構成される人工組織の培養例である。

【図 14】本発明の筋芽細胞の人工組織を用いた実験スキーム例を示す。

【図 15】本発明の筋芽細胞の人工組織を移植して4週間後の様子を示す写真である。各々10倍、200倍、1000倍を示す。

【図 16】本発明の筋芽細胞の人工組織を用いた移植手術例を示す。

【図 17】本発明の筋芽細胞の人工組織を用いた移植例における組織染色を示す。上段は、右から人工組織、細胞注射およびコントロールを示す (×10)。下段は、その400倍の写真を示す。

【図 18】本発明の筋芽細胞の人工組織を用いた移植例における超音波エコー図 (上段) およびMモード分析 (下段) の結果例を示す。左側は梗塞心であり、右側は処置後を示す。

【図 19】本発明の筋芽細胞の人工組織を用いた移植例における人工組織の心機能検査の結果例を示す。ここでは、拍出率 (EF)、拍出率短縮 (FS)、終期収縮期血圧 (ESA)、E波 (E-Wave) を示す。ひし形は筋芽細胞の人工組織を示し、四角は筋芽細胞の細胞注射例を示す。三角はコントロールである。

【図 20】本発明の筋芽細胞の人工組織と筋芽細胞との壁圧の比較を示す例である。各写真 (左上は人工組織、右上は細胞注射、右下はコントロール) の結果をまとめたものを左下のグラフに示す。

【図 21】本発明の筋芽細胞の人工組織とコントロールとのデスミン染色、第VIII因子染色およびGFP発現の比較を示す例である。上段は、左側にデスミン染色 (人工組織) を示し、右側にGFP発現 (人工組織) の様子を示す。真ん中にGFP発現のコントロールを示す。下段は第VIII因子染色を示す。下段は右川人工組織、細胞注射、コントロールを示す。

【図 22 A】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 22 B】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 22 C】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 2 2 D】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 2 2 E】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 2 2 F】本発明の人工組織を用いた場合の電気生理学的結合を示す図である。A～Cはコントロールを示し、D～Fは筋芽細胞の人工組織を示す。筋芽細胞の人工組織は、電気生理学的結合が観察される。

【図 2 3 A】本発明の人工組織を用いた場合の G F P 発現を示す図である。G F P の発現の様子を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 3 B】本発明の人工組織を用いた場合の G F P 発現を示す図である。G F P の発現の様子を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 3 C】本発明の人工組織を用いた場合の G F P 発現を示す図である。G F P の発現の様子を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 4 A】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 4 B】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 4 C】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図 2 5 A】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。Aはコントロールを示し、Bは本発明の人工組織を用いた場合を示す。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図 2 5 B】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。Aはコントロールを示し、Bは本発明の人工組織を用いた場合を示す。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図 2 5 C】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を経時的に示す。Aはコントロールを示し、Bは本発明の人工組織を用いた場合を示す。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図 2 6】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。別の時点での図 2 5 とおなじサンプルを示した写真である。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図 2 7】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。別の時点での図 2 5 とおなじサンプルを示した写真である。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図 2 8】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。別の時点での図 2 5 とおなじサンプルを示した写真である。超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。左側は梗塞

心のコントロールであり、右側は本発明の筋芽細胞シートでの結果を示す。

【図29A】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図29B】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図29C】本発明の人工組織を用いた処置における超音波エコーによる分析例を示す。本発明の処置による梗塞心の超音波エコー図の結果を動画表示し、その中で代表的なコマを静止画として表したものである。

【図30】心筋症ハムスターにおいて本発明の筋芽細胞を用いた人工組織のマッソントリクローム染色例を示す。上段は、シート（人工組織）移植、細胞移植、コントロールを示す（ $\times 10$ ）。下段は、それぞれの拡大図（ $\times 40$ ）である。

【図31】心筋症ハムスターにおいて本発明の筋芽細胞を用いた人工組織（シート）の移植後の生存率を示す。細胞そのものの注入と人工組織の投与の比較を示す。

【図32】本発明の人工組織の移植後の電気的特性を示す。左側に心筋細胞の人工組織を示し、右側に筋芽細胞を用いた人工組織を示す。

【図33】本発明の人工組織の拡張型心筋症ハムスターにおける治療例を示す。左側にEFを示し、右側上にHE染色を示し、右側下にマッソントリクローム染色を示す。

。【図34】本発明の人工組織のブタ梗塞モデルにおける治療例を示す。

【図35】本発明の人工組織のブタ梗塞モデルにおける治療効果を収縮能で示す。

【図36】本発明の人工組織のブタ梗塞モデルにおける治療効果を拡張能で示す。

【図37】アスコルビン酸なしでの人工組織生産法で生産されたシートを示す。

【図38】本発明の人工組織生産法におけるアスコルビン酸ありでの人工組織生産法で生産された人工組織を示す。

【図39】本発明の人工組織生産法におけるアスコルビン酸ありでの人工組織生産法で生産された人工組織におけるHE染色を示す。

【図40】応力および歪みの特性を測定することによって引っ張り強さを決定するための手法を示す。

【図41】荷重除荷曲線を得るための方法を示す。

【図42】滑膜細胞をアスコルビン酸2リン酸存在下で培養したときの組織の様子を示す。

【図43】滑膜細胞を用いた場合の、温度応答性培養皿を用いた人工組織作製の模式図を示す。この例では、 37°C で疎水性の膜が 20°C では親水性になる。

【図44】図44は、滑膜細胞を用いた人工組織作成例を示す。

【図45】図45は、滑膜細胞の人工組織の細胞外マトリクス染色例を示す。

【図46】力学的特性を測定する装置例を示す。

【図47】力学的特性を測定する装置の試験片把持部を示す。

【図48】力学的特性を測定する装置の拡大図を示す。試験片にはマーカーが付されている。

【図49】図49は、試験片把持部の拡大図を示す。

【図50】図50は、人工組織の破断実験後の様子を示す。

【図51】本発明の人工組織（滑膜組織由来）の力学的特性試験結果例を示す。

【図52】本発明の人工組織（滑膜組織由来）の力学的特性試験結果の別の例を示す。

。【図53】本発明の骨化誘導実験の例および結果を示す。上半分に、骨分化誘導のスキームを示す。誘導は、 $10\mu\text{M}$ デキサメタゾン、 10mM β -グリセロホスファテート、および $50\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸2リン酸の存在下で行った。左下の図は、コントロールを示し、左中の図は、骨分化したサンプルの写真を示す。真ん中

の図は、アリザリンレッドで染色した写真である。右下の図は、コントロールをALP染色した図を示す。右中の図は、骨分化したサンプルのALP染色の結果を示す。

【図54】本発明の軟骨移植実験の例および結果を示す。上半分は、培養の様子を示す。部分軟骨損傷への人工組織の接着を示す（インビトロ）。まず、表在性帯を取り除き、コンドロイチナーゼABCで消化した（Hinziker EB, JBS, 1996）。左下の図は、 $\times 40$ の写真を示し、右下の図は $\times 200$ の図を示す。示されるように、損傷面に密に密着している様子がわかる。

【図55】本発明の軟骨移植実験の例および結果を示す。これは、部分損傷軟骨への人工組織の接着を示す。左には、10日目の細胞（間葉系幹細胞）を示す。左側上には $\times 40$ の拡大写真および左側下には $\times 200$ の拡大写真を示す。

【図56】本発明の人工組織の軟骨移植実験における癒合を示す。10日目の様子が例示される。右にはHE染色が示され、中にはフィブロネクチン染色が示され、左にはビトロネクチン染色が示される。

【図57】本発明の人工組織の半月修復実験結果を示す。左には、半月が露出するように大腿骨および前角部の部分を開いた図を示す。右には、直径6mmの欠損を作製した結果を示す。

【図58】本発明の人工組織の半月修復実験結果を示す。左には、滑膜由来の人工組織（左下）を欠損部に入れる前の様子を示し、右には、滑膜由来の人工組織を欠損部に充填した後の写真を示す。

【図59】本発明の人工組織の半月修復実験結果を示す。コラーゲンシートにより被覆した様子を示す。左には、ギプスで固定する様子を示し、右には、術後の様子を示す。

【図60】本発明の人工組織の半月修復実験結果を示す。術後4週の肉眼像を示す。左上には、コラーゲンシートで被覆した様子を示し、右上には、半月の様子を示す。相対する軟骨表面に摩擦等による変性、損傷所見なしとなり、回復したことが示された。左下および右下には、シートを除去した後の修復部を示す。

【図61】本発明の人工組織の半月修復実験結果を示す。組織像が示される。上には、実寸大の写真を示し、左下には、修復部実質部を示す。右下には、隣接半月との境界部を示す。左下および右下とも倍率は200倍である。

【図62】図62は、ブタ筋芽細胞を用いた場合の人工組織作製例を示す。A-aは、 10^7 細胞/cm²、アスコルビン酸1リン酸を1.0mMおよびアスコルビン酸2リン酸5.0mMで播種した場合の組織写真を示す。A-bは、 10^5 細胞/cm²、アスコルビン酸1リン酸を0.1mMおよびアスコルビン酸2リン酸0.5mMで播種した場合の組織写真を示す。Cは、 5×10^5 細胞/cm²で播種した際の組織の様子を示す。示されるように、組織化（シート化）していない。

【図63】図63は、異なる皿の大きさでの人工組織の作製の様子を示す。Pは継代数を示し、写真の中の数字は、細胞数/cm²を示す。

【図64】図64は、異なる継代数の細胞での人工組織の作製の様子を示す。*は35mm皿での培養、**は60mm皿での培養、***は100mm皿での培養を示す。

【図65】図65は、ブタ筋芽細胞の人工組織を用いた場合の心臓の機能回復を示すデータである。大網を使用した場合も含む。N+S; 大網+シート、N; 大網、C; コントロールを示す。Preは、処置前、Postは処置後を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0440】

（配列表の説明）

配列番号1は、ミオシン重鎖IIa（ヒト：アクセッション番号NM_017534）の核酸配列を示す。

配列番号2は、ミオシン重鎖IIa（ヒト：アクセッション番号NM_017534）のアミノ酸配列を示す。

配列番号 3 は、ミオシン重鎖IIb (ヒト: アクセッション番号NM_017533) の核酸配列を示す。

配列番号 4 は、ミオシン重鎖IIb (ヒト: アクセッション番号NM_017533) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 5 は、ミオシン重鎖IIId(IIx) (ヒト: アクセッション番号NM_005963) の核酸配列を示す。

配列番号 6 は、ミオシン重鎖IIId(IIx) (ヒト: アクセッション番号NM_005963) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 7 は、CD56 (ヒト: アクセッション番号U63041) の核酸配列を示す。

配列番号 8 は、CD56 (ヒト: アクセッション番号U63041) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 9 は、ヒトMyoDの核酸配列 (GENBANK登録番号: X56677) を示す。

配列番号 10 は、配列番号 2 の核酸配列にコードされるポリペプチド配列を示す。

配列番号 11 は、ヒト筋原性因子5 (myogenic factor 5) (MYF5) の核酸配列 (GENBANK登録番号: NM_005593) を示す。

配列番号 12 は、配列番号 3 の核酸配列にコードされるポリペプチド配列を示す。

配列番号 13 は、ヒトミオゲニン (myogenin) (筋原性因子4) の核酸配列 (GENBANK登録番号: BT007233) を示す。

配列番号 14 は、配列番号 5 の核酸配列にコードされるポリペプチド配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Cardio, Inc.

<120> Functional prosthetic tissue

<130> J1-04040011

<150> JP2003-285475

<151> 2003/08/01

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5956

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgagttctg actcagaatt ggctgttttt ggggaggctg ctcctttcct ccgaaagtct	60
gaaagggaac gcattgaggc ccagaatagg ccctttgatg ccaaaacatc tgtctttgtg	120
gcggagccca aagaatcctt tgtcaaaggg accatccaga gcagagaagg aggaaaagtg	180
acggtgaaga ctgagggagg agcgactctg acagtgaagg atgatcaggt cttcccatg	240
aaccctccca aatatgacaa gatcgaggat atggccatga tgactcatct gcatgagcct	300
gctgtgctgt acaacctcaa agaacgttat gcagcctgga tgatctacac ctattcaggt	360
ctcttctgtg tctactgtcaa cccctacaag tggctgcctg tgtataagcc cgaggtgggtg	420
acagcctacc gaggcaaaaa gcgccaggag gccccgcccc acatcttctc catctctgac	480
aacgcctatc agttcatgct gactgaccga gagaatcagt caatcctgat cactggagaa	540
tctggtgcag ggaagactgt gaacaccaag cgtgtcatcc agtactttgc aacaattgca	600
gttactgggtg agaagaagaa ggaagaaatt acttctggca aaatacaggg gactctggaa	660
gatcaaatca tcagtgccaa cccctactg gaggcctttg gcaacgcaa gaccgtgagg	720
aatgacaact cctctcgctt tggtaaattc atcagaatcc actttggcac tactggaaaa	780
ctggcatctg ctgatattga aacatatctg ctagagaagt ctagagttgt tttccagctt	840

aaggctgaga gaagttatca ttttttttac cagattacat cgaataagaa accagaactt 900
attgaaatgc ttctgattac cacgaaccca tatgattacc catttgtcag tcaaggggag 960
atcagtgtgg ccagcatcga tgatcaggaa gaactgatgg ccacagatag tgctattgat 1020
attttgggct ttactaatga agaaaaggtc tccattttaca agctcacggg ggctgtgatg 1080
cattatggga acctaaaatt taagcaaaag cagcgtgagg agcaagcaga gccagatggc 1140
acagaagttg ctgacaaggc ggcctacctc cagagtctga actctgcaga tctgctcaaa 1200
gctctctgct accccagggt caaggtcggc aatgagtatg tcaccaaagg ccagactgta 1260
gaacaggtgt ccaacgcagt aggtgctctg gccaaagccg tctacgagaa gatgttctg 1320
tggatggttg cccgcatcaa ccagcagctg gacaccaagc agcccaggca gtacttcac 1380
ggggtcttgg acattgctgg ttttgagatt tttgatttca acagcctgga gcagctgtgc 1440
atcaatttca ccaatgagaa actgcaacag tttttcaacc accacatgtt cgtgctggag 1500
caggaggagt acaagaagga aggcacgcag tggacgttca tcgacttcgg gatggacctg 1560
gctgcctgca tcgagctcat cgagaagcct atgggcatct tctccatcct ggaagaggag 1620
tgcatgttcc ctaaggcaac agacacctcc ttcaagaaca agctgtatga ccagcacctg 1680
ggcaagtctg ccaacttcca gaagcccaag gtgggtcaaag gcaaggccga ggccccacttc 1740
gctctgattc actatgctgg tgttgtggac tacaacatta ctggctggct ggagaagaac 1800
aaggaccccc tgaatgagac cgtggttgga ctgtaccaga agtctgcaat gaaaactcta 1860
gctcagctct tctctggggc tcaaactgct gaaggagagg gagctggtgg aggggccaag 1920
aaaggtggta agaagaaggg ctcttctttc cagacagtgt ctgccctttt cagagagaat 1980
ttgaacaagc tgatgaccaa cctcaggagt acccatcctc actttgtgag gtgtatcatc 2040
cccaatgaga caaaaactcc tggtgccatg gagcatgagc ttgtcctcca ccagctgagg 2100
tgtaacggtg tgctggaagg catccgcac tgtaggaaag gatttccaag cagaatcctt 2160
tatgcagact tcaaacagag atacaaggta ttaaagtcaa gtgcaatccc tgaagggcaa 2220
ttcattgata gcaagaaggc ctctgagaag ctccttgcac ccatcgacat tgaccacacc 2280
cagtataaat ttgggcacac caaggtcttt ttcaaagctg gtcttctggg gctcctagag 2340

gagatgcgag atgacaagct ggcccagctg attacccgaa cccaggccag gtgcagaggg 2400
ttcttggcaa gagtggagta ccagaggatg gtggagagaa gggaggccat cttctgtatc 2460
cagtacaata tcagatcctt catgaatgtc aagcactggc cctggatgaa actcttcttc 2520
aagatcaagc ctctgttgaa gagtgcagaa actgagaagg agatggccac catgaaggaa 2580
gaatttcaga aaattaaaga cgaacttgcc aagtcagagg caaaaaggaa ggaactggaa 2640
gaaaagatgg tgacgctgtt gaaagaaaa aatgacttgc agctccaagt tcaggctgaa 2700
gccgaaggct tggctgatgc agaggaaagg tgtgaccagc taatcaaaac caaatccag 2760
ctagaagcca aaatcaaaga ggtgactgag agagctgagg atgaggaaga gatcaatgct 2820
gagctgacag ccaagaagag gaaactggag gatgaatgtt cagaactcaa gaaagacatt 2880
gatgaccttg agctgacact ggccaagggtt gagaaggaga aacatgccac agaaaacaag 2940
gtgaaaaacc tcacagaaga gatggcaggt ctggatgaaa ccattgctaa gctgaccaag 3000
gagaagaagg ctctccagga ggcccaccag cagaccctgg atgacctgca ggcagaggag 3060
gacaaagtca acaccctgac caaagctaaa atcaaacttg aacaacaagt ggatgatctt 3120
gaagggtcct tggagcaaga aaagaaactt cgcatggacc tagaaagggc taagaggaaa 3180
cttgagggtg acttgaagtt ggcccaagaa tccataatgg acattgaaaa tgagaaacag 3240
caacttgatg aaaagctcaa aaagaaagag tttgaaatca gcaatctgca aagcaagatt 3300
gaagatgaac aggcacttgg cattcaattg cagaagaaaa ttaaagaatt gcaagcccgc 3360
attgaggagc tggaggagga aatcgaggcg gagcgggcct cccggggcaa agcagagaag 3420
cagcgctctg acctctcccg ggagctggag gagatcagcg agaggctgga agaagccggt 3480
ggggccactt cagcccagat tgagatgaac aagaagcggg aggctgagtt ccagaaaatg 3540
cgcagggacc tggaggaggc caccctacag catgaagcca cagcggccac cctgaggaa 3600
aagcatgcag atagtgtggc cgagcttggg gagcagattg acaacctgca gcgagtgaag 3660
cagaagctgg agaaggagaa gagtgagatg aagatggaga ttgatgacct tgctagtaat 3720
gtagaaacgg tctccaaagc caagggaaac ctagagaaaa tgtgccggac tctagaggac 3780
caactgagtg aactgaaatc aaaggaagag gagcagcagc ggctgatcaa tgacctgact 3840

gcgcagaggg gggccttgca gactgaatct ggtgagtttt cacgccagct tgatgaaaag 3900
gaagctctgg tgtctcagtt atcaagaggc aaacaagcct ttactcaaca gattgaagaa 3960
ttaaagaggc aacttgaaga ggagataaaa gccaagaacg ccctggcgca tgccttcag 4020
tcttcccgcc acgactgtga cctgctgcgg gaacagtatg aggaggagca ggaatccaag 4080
gccgagctgc agagagcact gtccaaggcc aacaccgagg ttgcccaatg gaggaccaa 4140
tacgagacgg acgccatcca gcgcacagag gagctggagg aggccaagaa gaagctggcc 4200
cagcggctgc aggagctga ggaacatgta gaagctgtga acgccaatg tgcttcctc 4260
gaaaagacga agcagcggct gcagaatgag gtcgaggacc tcatgcttga tgtggagagg 4320
acaaatgccg cctgtgccgc cttgacaaa aagcaaagga acttcgataa gatcctggca 4380
gaatggaaac agaaatgtga ggaaacgcat gctgagcttg aggcctcca gaaggaggcc 4440
cgttcccttg gcactgagct gttcaagata aagaatgcct atgaggaatc tttggatcag 4500
ctagaaacc tgaagcgaga gaacaaaaac ttacagcagg agatttctga cctcacggaa 4560
cagattgcag aaggagggaa acgtatccat gaactggaga aaataaagaa acaagtggaa 4620
caagaaaagt gtgaacttca ggctgcttta gaagaagcag aggcattctt tgaacatgaa 4680
gagggaaaga tcctgcgcat ccagcttgag ttgaaccaag tcaagtctga ggttgatagg 4740
aaaattgctg aaaaagatga ggaaattgac cagctgaaga gaaaccacat tagaatcgtg 4800
gagtcctgc agagcacgct ggatgctgag atcaggagta ggaatgatgc cattaggctc 4860
aagaagaaga tggagggaga cctcaatgaa atggaaatcc agctgaacca tgccaaccgc 4920
atggctgctg aggccctgag gaactacagg aacacccaag gcatcctcaa ggataccag 4980
atccacctgg atgatgctct ccggagccag gaggacctga aggaacagct ggccatggtg 5040
gagcgcagag ccaacctgct gcaggctgag atcaggagc tgcgggccac tctggaacag 5100
acagagagga gcagaaaaat cgcagaacag gagctcctgg atgccagtga gcgtgttcag 5160
ctactgcaca ccagaacac cagcctgac aacaccaaga agaagctgga gacagatatt 5220
tcccaaatgc aaggagagat ggaggacatt ctccaggaag cccgcaatgc agaagaaaag 5280
gccaagaagg ccatcactga tgccgcatg atggctgagg agctgaagaa ggagcaggac 5340

accagcgcgc acctggagcg gatgaagaag aacatggagc agaccgtgaa ggatctgcag 5400
 ctccgtctgg atgaggctga gcagctggcc ctgaagggtg ggaagaagca gatccagaaa 5460
 ctggaggcca gggtagcgga gctggaagga gaggttgaga gtgagcaaaa gcgtaatgct 5520
 gaggctgtca aaggtctgcg caaacatgag aggcgagtga aggaactcac ttaccagacg 5580
 gaagaagata gaaagaatat tctcaggctt caagatttgg tagataaact tcaggcaaaa 5640
 gtgaaatctt ataagagaca agctgaggag gctgaggaac aatccaacac caatctagct 5700
 aaattccgca agctccagca tgagctggag gaggccgagg aacgggctga cattgctgag 5760
 tcccaggtga acaaactgcg ggtgaagagc cgggaggttc acacaaaagt cataagtga 5820
 gagtgatcat gtcctgatgc catggaatga ctgaagacag gcacaaaatg tgacatcttt 5880
 ggtcatttcc ctctgtaatt attgtgtatt ctaccctgtt gcaaaggaaa taaagcatag 5940
 ggtagtttgc aaacaa 5956

<210> 2

<211> 1941

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Asp Ser Glu Leu Ala Val Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Ser Glu Arg Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Arg Pro Phe
 20 25 30

Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Ala Glu Pro Lys Glu Ser Phe Val
 35 40 45

Lys Gly Thr Ile Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Val Lys Thr
 50 55 60

Glu Gly Gly Ala Thr Leu Thr Val Lys Asp Asp Gln Val Phe Pro Met
 65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His
85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala
100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro
115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Lys Pro Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg
130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp
145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu
165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val
180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu
195 200 205

Glu Ile Thr Ser Gly Lys Ile Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile
210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg
225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly
245 250 255

Thr Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu
260 265 270

Lys Ser Arg Val Val Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile
275 280 285

Phe Tyr Gln Ile Thr Ser Asn Lys Lys Pro Glu Leu Ile Glu Met Leu
290 295 300

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Tyr Pro Phe Val Ser Gln Gly Glu
305 310 315 320

Ile Ser Val Ala Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp
325 330 335

Ser Ala Ile Asp Ile Leu Gly Phe Thr Asn Glu Glu Lys Val Ser Ile
340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Leu Lys Phe Lys
355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala
370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys
385 390 395 400

Ala Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Tyr Val Thr Lys
405 410 415

Gly Gln Thr Val Glu Gln Val Ser Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys
420 425 430

Ala Val Tyr Glu Lys Met Phe Leu Trp Met Val Ala Arg Ile Asn Gln
435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp
450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys
465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met
485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Thr
500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu
515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro
530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Asp Gln His Leu
545 550 555 560

Gly Lys Ser Ala Asn Phe Gln Lys Pro Lys Val Val Lys Gly Lys Ala
565 570 575

Glu Ala His Phe Ala Leu Ile His Tyr Ala Gly Val Val Asp Tyr Asn
580 585 590

Ile Thr Gly Trp Leu Glu Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val
595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Gln Leu Phe
610 615 620

Ser Gly Ala Gln Thr Ala Glu Gly Glu Gly Ala Gly Gly Gly Ala Lys
625 630 635 640

Lys Gly Gly Lys Lys Lys Gly Ser Ser Phe Gln Thr Val Ser Ala Leu
645 650 655

Phe Arg Glu Asn Leu Asn Lys Leu Met Thr Asn Leu Arg Ser Thr His
660 665 670

Pro His Phe Val Arg Cys Ile Ile Pro Asn Glu Thr Lys Thr Pro Gly
675 680 685

Ala Met Glu His Glu Leu Val Leu His Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val
690 695 700

Leu Glu Gly Ile Arg Ile Cys Arg Lys Gly Phe Pro Ser Arg Ile Leu
705 710 715 720

Tyr Ala Asp Phe Lys Gln Arg Tyr Lys Val Leu Asn Ala Ser Ala Ile
725 730 735

Pro Glu Gly Gln Phe Ile Asp Ser Lys Lys Ala Ser Glu Lys Leu Leu
740 745 750

Ala Ser Ile Asp Ile Asp His Thr Gln Tyr Lys Phe Gly His Thr Lys
755 760 765

Val Phe Phe Lys Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu Glu Glu Met Arg Asp
770 775 780

Asp Lys Leu Ala Gln Leu Ile Thr Arg Thr Gln Ala Arg Cys Arg Gly
785 790 795 800

Phe Leu Ala Arg Val Glu Tyr Gln Arg Met Val Glu Arg Arg Glu Ala
805 810 815

Ile Phe Cys Ile Gln Tyr Asn Ile Arg Ser Phe Met Asn Val Lys His
820 825 830

Trp Pro Trp Met Lys Leu Phe Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser
835 840 845

Ala Glu Thr Glu Lys Glu Met Ala Thr Met Lys Glu Glu Phe Gln Lys
850 855 860

Ile Lys Asp Glu Leu Ala Lys Ser Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu
865 870 875 880

Glu Lys Met Val Thr Leu Leu Lys Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln
885 890 895

Val Gln Ala Glu Ala Glu Gly Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp
900 905 910

Gln Leu Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val
915 920 925

Thr Glu Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala
930 935 940

Lys Lys Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile
945 950 955 960

Asp Asp Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala
965 970 975

Thr Glu Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp
980 985 990

Glu Thr Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala
995 1000 1005

His Gln Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Ala Glu Glu Asp Lys Val
1010 1015 1020

Asn Thr Leu Thr Lys Ala Lys Ile Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp
1025 1030 1035

Asp Leu Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Leu Arg Met Asp
1040 1045 1050

Leu Glu Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala
1055 1060 1065

Gln Glu Ser Ile Met Asp Ile Glu Asn Glu Lys Gln Gln Leu Asp
1070 1075 1080

Glu Lys Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Ile Ser Asn Leu Gln Ser
1085 1090 1095

Lys Ile Glu Asp Glu Gln Ala Leu Gly Ile Gln Leu Gln Lys Lys
1100 1105 1110

Ile Lys Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile
1115 1120 1125

Glu Ala Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser
1130 1135 1140

Asp Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu
1145 1150 1155

Ala Gly Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Met Asn Lys Lys Arg
1160 1165 1170

Glu Ala Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ala Thr
1175 1180 1185

Leu Gln His Glu Ala Thr Ala Ala Thr Leu Arg Lys Lys His Ala
1190 1195 1200

Asp Ser Val Ala Glu Leu Gly Glu Gln Ile Asp Asn Leu Gln Arg
1205 1210 1215

Val Lys Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Met Lys Met Glu
1220 1225 1230

Ile Asp Asp Leu Ala Ser Asn Val Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys
1235 1240 1245

Gly Asn Leu Glu Lys Met Cys Arg Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ser
1250 1255 1260

Glu Leu Lys Ser Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Asp
1265 1270 1275

Leu Thr Ala Gln Arg Gly Arg Leu Gln Thr Glu Ser Gly Glu Phe
1280 1285 1290

Ser Arg Gln Leu Asp Glu Lys Glu Ala Leu Val Ser Gln Leu Ser
1295 1300 1305

Arg Gly Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg
1310 1315 1320

Gln Leu Glu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Asn Ala Leu Ala His Ala
1325 1330 1335

Leu Gln Ser Ser Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr
1340 1345 1350

Glu Glu Glu Gln Glu Ser Lys Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser
1355 1360 1365

Lys Ala Asn Thr Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr
1370 1375 1380

Asp Ala Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys
1385 1390 1395

Leu Ala Gln Arg Leu Gln Ala Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val
1400 1405 1410

Asn Ala Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln
1415 1420 1425

Asn Glu Val Glu Asp Leu Met Leu Asp Val Glu Arg Thr Asn Ala
1430 1435 1440

Ala Cys Ala Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Ile
1445 1450 1455

Leu Ala Glu Trp Lys Gln Lys Cys Glu Glu Thr His Ala Glu Leu
1460 1465 1470

Glu Ala Ser Gln Lys Glu Ala Arg Ser Leu Gly Thr Glu Leu Phe
1475 1480 1485

Lys Ile Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp Gln Leu Glu Thr
1490 1495 1500

Leu Lys Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu
1505 1510 1515

Thr Glu Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys Arg Ile His Glu Leu Glu
1520 1525 1530

Lys Ile Lys Lys Gln Val Glu Gln Glu Lys Cys Glu Leu Gln Ala
1535 1540 1545

Ala Leu Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys
1550 1555 1560

Ile Leu Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Val
1565 1570 1575

Asp Arg Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Ile Asp Gln Leu Lys
1580 1585 1590

Arg Asn His Ile Arg Ile Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp
1595 1600 1605

Ala Glu Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Ile Arg Leu Lys Lys Lys
1610 1615 1620

Met Glu Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala
1625 1630 1635

Asn Arg Met Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Tyr Arg Asn Thr Gln
1640 1645 1650

Gly Ile Leu Lys Asp Thr Gln Ile His Leu Asp Asp Ala Leu Arg
1655 1660 1665

Ser Gln Glu Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg
1670 1675 1680

Ala Asn Leu Leu Gln Ala Glu Ile Glu Glu Leu Arg Ala Thr Leu
1685 1690 1695

Glu Gln Thr Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Glu Gln Glu Leu Leu
1700 1705 1710

Asp Ala Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser
1715 1720 1725

Leu Ile Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Met
1730 1735 1740

Gln Gly Glu Met Glu Asp Ile Leu Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu
1745 1750 1755

Glu Lys Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu
1760 1765 1770

Glu Leu Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met
1775 1780 1785

Lys Lys Asn Met Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln Leu Arg Leu
1790 1795 1800

Asp Glu Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile
1805 1810 1815

Gln Lys Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Gly Glu Val Glu
1820 1825 1830

Ser Glu Gln Lys Arg Asn Ala Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys
 1835 1840 1845

His Glu Arg Arg Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp
 1850 1855 1860

Arg Lys Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln
 1865 1870 1875

Ala Lys Val Lys Ser Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu
 1880 1885 1890

Gln Ser Asn Thr Asn Leu Ala Lys Phe Arg Lys Leu Gln His Glu
 1895 1900 1905

Leu Glu Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val
 1910 1915 1920

Asn Lys Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Val Ile
 1925 1930 1935

Ser Glu Glu
 1940

<210> 3
 <211> 6016
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atccttcctc aaaattcttg aagtagttgt ctgctttgag cctgccacct tcttcatctg 60
 ataatacaag aggtatacct agtccagcac tgccatcaat aacctgcagc catgagttct 120
 gactctgaga tggccatttt tggggaggct gtcctttcc tccgaaagtc tgaaaaggag 180
 cgaattgaag ctcagaacaa gccttttgat gccaagacat cagtctttgt ggtggaccct 240
 aaggagtcct acgtgaaagc aatagtgag agcagggaag gggggaaggt gacagccaag 300

accgaagctg gagctactgt aactgtgaaa gaagaccaag tcttctccat gaaccctccc 360
aaatatgaca agatcgagga catggccatg atgactcacc tgcatgagcc tgctgtgctg 420
tataacctca aagagcgta cgcagcctgg atgatctaca cctactcggg cctcttctgt 480
gtcaccgtca acccctacaa gtggctgccg gtgtacaacc ctgagggtggg gacagcctac 540
cgaggcaaaa agcgccagga ggccccaccc catatcttct ccatctctga caatgcctat 600
cagttcatgc taactgatcg tgaaccag tcaatcttga ttactggaga atctgggtgca 660
gggaagactg tgaacacgaa gcgtgtcatc cagtactttg caacaattgc agttactgga 720
gagaagaaaa aagaggaacc tgcctctggc aaaatgcagg ggacccttga agatcaaacc 780
atcagtgtca acccctact ggaagccttc ggcaatgcc aagaccgtgag gaatgacaac 840
tcctctcgtt ttggtaaatt catcaggatc cttttgggtg ccacaggcaa actggcttct 900
gcagatattg aaacatatct gctagagaag tcccaggtta cttttcagct aaaggctgaa 960
agaagctacc acatatttta tcaaatcctg tccaataaga aaccagagct cattgaaatg 1020
cttctgatca ccaccaaccc atatgacttc gcatttgtca gccaagggga aattactgtg 1080
cccagcattg atgaccagga agagctgatg gccacagata gtgctgtgga catcctgggt 1140
ttcactgctg atgaaaaggt ggccatttac aagctcactg gagccgtgat gcattatggg 1200
aacatgaaat tcaagcaaaa gcaaaggga gagcaggcag agccagatgg cacggaagtt 1260
gctgacaaag ctgcttatct gacaagtctg aactctgtg acctgctcaa atctctctgc 1320
tatcccagag tcaaggtcgg caatgagttc gtaaccaaag gccagactgt gcagcagggtg 1380
tacaacgcag tgggtgctct ggccaaagcc atctacgaga agatgttcct gtggatggtc 1440
accgcatca accagcagct ggacaccaag cagcccaggc agtacttcat cggggctctg 1500
gacattgctg gctttgagat ctttgatttc aacagcctgg agcagctgtg catcaacttc 1560
accaacgaga aactgcaaca gttttcaac caccacatgt tcgtgctgga gcaggaagag 1620
tacaagaagg aaggcatcga gtgggagttc attgacttcg ggatggacct ggctgcctgc 1680
atcgagctca tcgagaagcc tatgggcatc ttctccatcc tagaagagga gtgcatgttc 1740
cccaaggcaa cagacacctc cttaagaac aagctgtatg aacaacatct tggaaaatcc 1800

aacaatticc agaagcccaa gcctgccaaa ggcaagcctg aggctcactt ctcactgggtg 1860
cactatgccg gcaccgtgga ctacaacatc gccggctggc tggacaaaaa caaggacccc 1920
ctgaatgaga ctgtgggtggg gctgtaccag aagtctgcaa tgaagactct ggctttcctc 1980
ttctctgggg cacaaactgc tgaagcagag ggtgggtggg gaaagaaagg tggcaaaaag 2040
aagggttctt ctttccagac agtgtcagct cttttcaggg agaatttgaa taagctgatg 2100
accaacttga ggagcactca ccccccactt gtgcggtgca tcatcccca tgaactaaa 2160
actcctgggt ccatggagca tgagcttgct ctgcatcagc tgagggtgaa cgggtgtgctg 2220
gaaggcatcc gcatctgcag gaaaggcttc ccaagcagaa tcctttatgc agacttcaaa 2280
cagagataca aggttctaaa tgcgagtgt atcccagagg gtcagttcat tgacagcaag 2340
aaggcttctg agaaacttct aggggtctatt gaaattgacc acaccagta caaattcgggt 2400
cataccaagg ttttcttcaa agctggcctg ctgggaactc tagaagaaat gcgagatgaa 2460
aagctagctc aactcatcac gcgcactcaa gccatatgca gggggttcct gatgagagtg 2520
gagttcagaa agatgatgga gaggagagag tccatcttct gcattcagta caacatccgt 2580
gctttcatga atgtgaagca ctggccctgg atgaagctgt atttcaagat caagcccctc 2640
ctcaagagtg cagagacaga gaaggagatg gccaacatga aggaagaatt tgagaaaacc 2700
aaagaagagc tggctaagac agaggcaaaa aggaaagaac tagaagaaaa gatggtgacg 2760
ctaattgcaag agaaaaatga cttacaactc caagttcaag ctgaagcaga tgccttggct 2820
gatgcagagg aaagatgtga tcagttgatt aaaacaaaa tccaacttga ggccaaaatc 2880
aaagaggtaa ctgaaagagc tgaggatgag gaagagatca atgctgagct gacagccaag 2940
aagaggaaac tggaggatga atgttcagag ctcaagaaag acattgatga ctttgagctg 3000
aactggcca aggttgagaa ggagaaacat gccacagaga acaaggtgaa aaacctcaca 3060
gaagagatgg caggtctgga tgaaaccatt gctaagctga ccaaggagaa gaaggctctc 3120
caggaggccc accagcagac cctggatgac ctgcagatgg aggaggacaa agtcaacacc 3180
ctgaccaaag ctaaaaccaa gctagaacag caagtggacg atcttgaagg atctctggaa 3240
caagaaaaga aactttgcat ggacttagaa agagccaaga gaaaactgga ggggtgaccta 3300

aaattggccc aagaatccac aatggataca gaaaatgaca aacagcaact taatgagaaa 3360
ctcaaaaaga aagagtttga aatgagcaat ctgcaaggca agattgaaga tgaacaagcc 3420
cttgcaatgc agctacaaaa gaagatcaaa gaattacagg cccgcattga ggagctggag 3480
gaggaaatcg aggcaagcgc ggcctcccgc gccaaagcag aaaagcagcg ctctgacctc 3540
tcccgggagc tggaggagat cagtgaagagg ctggaagaag ccggtggggc cacttcagcc 3600
cagattgagt tgaacaagaa gcgggaggct gagttccaga aaatgcgcag ggacctggaa 3660
gagtccacc tgcagcacga agccacggca gctgctcttc ggaagaagca cgcagatagt 3720
gtggctgagc ttgggaagca gatcgacagc cttcagcggg tcaagcagaa gctggagaag 3780
gaaaagagtg agctgaagat ggagatcaat gaccttgcta gtaacatgga gactgtctcc 3840
aaagccaagg caaactttga gaaaatgtgc cgcaccctag aggaccagct tagtgaaata 3900
aaaacaaagg aagaagagca gcaacgctta ataatgagt tgtcagccca gaaggcacgt 3960
ttacacacag aatcaggatga gttttcacga cagctagatg aaaaagatgc tatggtttct 4020
cagctatccc gaggcaaaca agcatttaca caacagattg aagaattaaa gaggcagcta 4080
gaagaggaga ctaaggccaa gagcactctg gcccatgccc tgcagtcagc ccgccatgac 4140
tgtgacctgc tgcgggaaca gtatgaggag gagcaggaag ccaaggctga gctgcagagg 4200
ggaatgtcca aggccaacag tgaggttgcc cagtggagga ccaagtacga gacggacgcc 4260
atccagcgca cagaggagct ggaggaggcc aagaagaagc tagcccagcg tctgcaggat 4320
gcagaagaac atgtagaagc tgtgaattcc aaatgtgctt ctcttgaaaa gacaaagcag 4380
aggctacaga atgaagtaga ggacctcatg attgatgtgg aacgatctaa tgctgcctgc 4440
atagctctcg ataagaagca aagaaacttt gacaagggtc tggcagaatg gaaacagaag 4500
tatgaggaaa ctcaggctga acttgaggcc tcccagaagg agtcgcgttc tctcagcact 4560
gagctgttca aggtgaagaa tgcctacgag gaatccctgg atcatcttga aactctaaag 4620
cgagagaata agaacttaca acaggagatt tctgacctga cagagcaaata tgcagagggt 4680
ggaaagcata tccatgaact ggagaaagta aagaaacaac ttgatcatga gaagagtga 4740
ctacagactt ccctagagga agcagaggca tctcttgagc atgaagaagg caaaattctt 4800

cgcatccaac ttgagctaaa tcaggtgaaa tctgagattg accgaaaaat tgctgaaaaa 4860
gatgaagaac tcgatcagct aaagaggaac catctcagag ttgtggagtc aatgcagagt 4920
acactggatg ctgagatcag gagcagaaat gatgctctga ggatcaagaa gaagatggag 4980
ggagatctta atgaaatgga aatccagctg aacctgcca accgccaggc tgctgaggca 5040
ctaaggaatc ttagaaacac acaaggaata ctgaaggaca ctcagctaca tttggatgat 5100
gccatcagag gccaagatga ccttaaggaa caattggcaa tggttgagcg cagagctaac 5160
ctgatgcagg ctgaagtga agagctcagg gcatccctgg aacggactga gagaggcagg 5220
aaaatggcag agcaagagct tctggatgcc agtgaacgtg tgcaacttct gcacactcag 5280
aacaccagcc tgatcaacac caagaagaag ctggaacag acatttcca aatccaggga 5340
gagatggagg acatcgtcca ggaagccgc aatgcagagg agaaggccaa gaaggccatc 5400
actgatgctg ccatgatggc tgaggagctg aagaaggaac aggacaccag cgcccacctg 5460
gagcggatga agaagaacat ggagcagacc gtgaaggatc tgcagctccg tctgggtgag 5520
gctgagcagc tggcgctgaa ggggtgggaag aagcagatcc agaaactgga ggccagggtg 5580
agagagcttg aaagtgaggt ggaaagtga cagaagcaca atgttgaggc tgtcaagggt 5640
cttcgcaaac atgagagaag agtgaaggaa ctcacttacc agactgagga ggaccgcaag 5700
aatattctca ggctgcagga cttggtggac aaattgcaaa ccaaagtcaa agcttacaag 5760
agacaagctg aagaggctga ggaacaatcc aatgtcaacc ttgccaagtt ccgcaagctc 5820
cagcacgagc tggaggaggc cgaggaacgg gctgacattg ctgagtcca agtcaacaag 5880
ctgagagtga agagtcggga ggttcacaca aaagtcataa gtgaagagta attcattcta 5940
atgaaagaaa atgtgaccaa agaaatgcac gaaatgtgaa gttctttgtc actgtcctgt 6000
atatcaagga aataaa 6016

<210> 4

<211> 1939

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ser Asp Ser Glu Met Ala Ile Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe
1 5 10 15

Leu Arg Lys Ser Glu Lys Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Lys Pro Phe
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Val Asp Pro Lys Glu Ser Tyr Val
35 40 45

Lys Ala Ile Val Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Ala Lys Thr
50 55 60

Glu Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Lys Glu Asp Gln Val Phe Ser Met
65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His
85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala
100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro
115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Asn Pro Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg
130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp
145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu
165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val
180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu
195 200 205

Glu Pro Ala Ser Gly Lys Met Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile
210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg
225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly
245 250 255

Ala Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu
260 265 270

Lys Ser Arg Val Thr Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile
275 280 285

Phe Tyr Gln Ile Leu Ser Asn Lys Lys Pro Glu Leu Ile Glu Met Leu
290 295 300

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Phe Ala Phe Val Ser Gln Gly Glu
305 310 315 320

Ile Thr Val Pro Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp
325 330 335

Ser Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Thr Ala Asp Glu Lys Val Ala Ile
340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Met Lys Phe Lys
355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala
370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Thr Ser Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys
385 390 395 400

Ser Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Phe Val Thr Lys
 405 410 415

Gly Gln Thr Val Gln Gln Val Tyr Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys
 420 425 430

Ala Ile Tyr Glu Lys Met Phe Leu Trp Met Val Thr Arg Ile Asn Gln
 435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp
 450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys
 465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met
 485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Glu
 500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu
 515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro
 530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Glu Gln His Leu
 545 550 555 560

Gly Lys Ser Asn Asn Phe Gln Lys Pro Lys Pro Ala Lys Gly Lys Pro
 565 570 575

Glu Ala His Phe Ser Leu Val His Tyr Ala Gly Thr Val Asp Tyr Asn
 580 585 590

Ile Ala Gly Trp Leu Asp Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val
 595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Phe Leu Phe
610 615 620

Ser Gly Ala Gln Thr Ala Glu Ala Glu Gly Gly Gly Gly Lys Lys Gly
625 630 635 640

Gly Lys Lys Lys Gly Ser Ser Phe Gln Thr Val Ser Ala Leu Phe Arg
645 650 655

Glu Asn Leu Asn Lys Leu Met Thr Asn Leu Arg Ser Thr His Pro His
660 665 670

Phe Val Arg Cys Ile Ile Pro Asn Glu Thr Lys Thr Pro Gly Ala Met
675 680 685

Glu His Glu Leu Val Leu His Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu
690 695 700

Gly Ile Arg Ile Cys Arg Lys Gly Phe Pro Ser Arg Ile Leu Tyr Ala
705 710 715 720

Asp Phe Lys Gln Arg Tyr Lys Val Leu Asn Ala Ser Ala Ile Pro Glu
725 730 735

Gly Gln Phe Ile Asp Ser Lys Lys Ala Ser Glu Lys Leu Leu Gly Ser
740 745 750

Ile Glu Ile Asp His Thr Gln Tyr Lys Phe Gly His Thr Lys Val Phe
755 760 765

Phe Lys Ala Gly Leu Leu Gly Thr Leu Glu Glu Met Arg Asp Glu Lys
770 775 780

Leu Ala Gln Leu Ile Thr Arg Thr Gln Ala Ile Cys Arg Gly Phe Leu
785 790 795 800

Met Arg Val Glu Phe Arg Lys Met Met Glu Arg Arg Glu Ser Ile Phe
805 810 815

Cys Ile Gln Tyr Asn Ile Arg Ala Phe Met Asn Val Lys His Trp Pro
820 825 830

Trp Met Lys Leu Tyr Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser Ala Glu
835 840 845

Thr Glu Lys Glu Met Ala Asn Met Lys Glu Glu Phe Glu Lys Thr Lys
850 855 860

Glu Glu Leu Ala Lys Thr Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu Glu Lys
865 870 875 880

Met Val Thr Leu Met Gln Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln Val Gln
885 890 895

Ala Glu Ala Asp Ala Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp Gln Leu
900 905 910

Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val Thr Glu
915 920 925

Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala Lys Lys
930 935 940

Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile Asp Asp
945 950 955 960

Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala Thr Glu
965 970 975

Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp Glu Thr
980 985 990

Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala His Gln
995 1000 1005

Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Met Glu Glu Asp Lys Val Asn Thr
1010 1015 1020

Leu Thr Lys Ala Lys Thr Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp Asp Leu
1025 1030 1035

Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Leu Cys Met Asp Leu Glu
1040 1045 1050

Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Glu
1055 1060 1065

Ser Thr Met Asp Thr Glu Asn Asp Lys Gln Gln Leu Asn Glu Lys
1070 1075 1080

Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Met Ser Asn Leu Gln Gly Lys Ile
1085 1090 1095

Glu Asp Glu Gln Ala Leu Ala Met Gln Leu Gln Lys Lys Ile Lys
1100 1105 1110

Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile Glu Ala
1115 1120 1125

Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser Asp Leu
1130 1135 1140

Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu Ala Gly
1145 1150 1155

Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Leu Asn Lys Lys Arg Glu Ala
1160 1165 1170

Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ser Thr Leu Gln
1175 1180 1185

His Glu Ala Thr Ala Ala Ala Leu Arg Lys Lys His Ala Asp Ser
1190 1195 1200

Val Ala Glu Leu Gly Lys Gln Ile Asp Ser Leu Gln Arg Val Lys
1205 1210 1215

Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Leu Lys Met Glu Ile Asn
1220 1225 1230

Asp Leu Ala Ser Asn Met Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys Ala Asn
1235 1240 1245

Phe Glu Lys Met Cys Arg Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ser Glu Ile
1250 1255 1260

Lys Thr Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Glu Leu Ser
1265 1270 1275

Ala Gln Lys Ala Arg Leu His Thr Glu Ser Gly Glu Phe Ser Arg
1280 1285 1290

Gln Leu Asp Glu Lys Asp Ala Met Val Ser Gln Leu Ser Arg Gly
1295 1300 1305

Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg Gln Leu
1310 1315 1320

Glu Glu Glu Thr Lys Ala Lys Ser Thr Leu Ala His Ala Leu Gln
1325 1330 1335

Ser Ala Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr Glu Glu
1340 1345 1350

Glu Gln Glu Ala Lys Ala Glu Leu Gln Arg Gly Met Ser Lys Ala
1355 1360 1365

Asn Ser Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr Asp Ala
1370 1375 1380

Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys Leu Ala
1385 1390 1395

Gln Arg Leu Gln Asp Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val Asn Ser
1400 1405 1410

Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln Asn Glu
1415 1420 1425

Val Glu Asp Leu Met Ile Asp Val Glu Arg Ser Asn Ala Ala Cys
1430 1435 1440

Ile Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Val Leu Ala
1445 1450 1455

Glu Trp Lys Gln Lys Tyr Glu Glu Thr Gln Ala Glu Leu Glu Ala
1460 1465 1470

Ser Gln Lys Glu Ser Arg Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val
1475 1480 1485

Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp His Leu Glu Thr Leu Lys
1490 1495 1500

Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu Thr Glu
1505 1510 1515

Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys His Ile His Glu Leu Glu Lys Val
1520 1525 1530

Lys Lys Gln Leu Asp His Glu Lys Ser Glu Leu Gln Thr Ser Leu
1535 1540 1545

Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys Ile Leu
1550 1555 1560

Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Ile Asp Arg
1565 1570 1575

Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Leu Asp Gln Leu Lys Arg Asn
1580 1585 1590

His Leu Arg Val Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp Ala Glu
1595 1600 1605

Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Leu Arg Ile Lys Lys Lys Met Glu
1610 1615 1620

Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala Asn Arg
1625 1630 1635

Gln Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Leu Arg Asn Thr Gln Gly Ile
1640 1645 1650

Leu Lys Asp Thr Gln Leu His Leu Asp Asp Ala Ile Arg Gly Gln
1655 1660 1665

Asp Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg Ala Asn
1670 1675 1680

Leu Met Gln Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Ser Leu Glu Arg
1685 1690 1695

Thr Glu Arg Gly Arg Lys Met Ala Glu Gln Glu Leu Leu Asp Ala
1700 1705 1710

Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser Leu Ile
1715 1720 1725

Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Ile Gln Gly
1730 1735 1740

Glu Met Glu Asp Ile Val Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu Glu Lys
1745 1750 1755

Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu Glu Leu
1760 1765 1770

Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met Lys Lys
1775 1780 1785

Asn Met Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln Leu Arg Leu Gly Glu
1790 1795 1800

Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile Gln Lys
1805 1810 1815

Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Ser Glu Val Glu Ser Glu
1820 1825 1830

Gln Lys His Asn Val Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys His Glu
1835 1840 1845

Arg Arg Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp Arg Lys
1850 1855 1860

Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln Thr Lys
1865 1870 1875

Val Lys Ala Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Gln Ser
1880 1885 1890

Asn Val Asn Leu Ala Lys Phe Arg Lys Leu Gln His Glu Leu Glu
1895 1900 1905

Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val Asn Lys
1910 1915 1920

Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Val Ile Ser Glu
1925 1930 1935

Glu

<210> 5

<211> 5925

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgagttctg actctgagat ggccattttt ggggaggctg ctcttttcct ccgaaagtct 60
gaaagggagc gaattgaagc ccagaacaag ctttttgatg ccaagacatc agtctttgtg 120
gtggacccta aggagtcctt tgtgaaagca acagtgcaga gcagggaagg ggggaagggtg 180
acagctaaga ccgaagctgg agctactgta acagtgaaag atgaccaagt cttcccatg 240
aaccctccca aatatgacaa gatcgaggac atggccatga tgactcatct acacgagcct 300
gctgtgctgt acaacctcaa agagcgctac gcagcctgga tgatctacac ctactcaggc 360
ttgttctgtg tcactgtcaa cccctacaag tggttgccag tgtataatgc agaagtgggtg 420
acagcctacc gaggcaaaaa gcgccaggaa gccccacccc acatcttctc catctctgac 480
aatgcctatc agttcatgct gactgatcgg gagaatcagt ctatcttgat caccggagaa 540
tctggcgcag ggaagactgt gaacaccaag cgtgtcatcc agtactttgc aacaattgca 600
gttactgggg agaagaagaa ggaagaagtt acttctggca aaatgcaggg gactctggaa 660
gatcaaatca tcagtgccaa cccctactg gaggccttg gcaacgccaa gaccgtgagg 720
aatgacaact cctctcgctt tggtaaattc atcaggatcc acttcggtac cacagggaaa 780
ctggcttctg ctgatattga aacatatctt ctggagaagt ctagagttac tttccagcta 840
aaggctgaaa gaagctatca tatTTTTTat cagatcatgt ctaacaagaa gccagatcta 900
attgaaatgc tcctgatcac caccaaccca tacgattatg ctttcgtcag tcaaggggag 960
atcacagtgc ccagcattga tgaccaagaa gagttgatgg ctacagatag tgccattgaa 1020
attctgggct ttacttcaga tgaaagagtg tccatctata agctcacagg ggctgtgatg 1080
cattatggga acatgaaatt caagcaaaag cagcgtgagg agcaagctga gccagatggc 1140
actgaagttg ctgacaaggc agcctatctc caaaatctga actctgcaga tctgctcaaa 1200

gccctctgct accctagggg caaggtcggc aatgagtatg tcaccaaagg tcaaactgtg 1260
cagcaggtgt acaatgcagt ggggtgctctg gccaaagctg tctacgataa gatgttcttg 1320
tggatgggtca cccgcatcaa ccagcagctg gacaccaagc agcccaggca gtacttcatt 1380
gggggtcttg acattgctgg ctttgagatc ttgtattca acagcctgga gcagctgtgc 1440
atcaacttca ccaatgagaa actgcaacag ttttcaacc accacatgtt cgtgctggag 1500
caggaggagt acaagaagga aggcattgag tggacgttca ttgactttgg gatggacctg 1560
gctgcctgca tcgagctcat cgagaagcct atgggcatct tctccatcct ggaagaggag 1620
tgcatgttcc ccaaggcgac agacacctcc ttcaagaaca agctgtatga acaacatctt 1680
ggaaaatcca ataacttcca gaagcccaag cctgccaaag gcaagcctga ggcccacttc 1740
tctttgattc actatgctgg caccgtggac tacaacattg ccggctggct tgacaagaac 1800
aaggaccccc tgaatgagac tgtggtgggg ctgtaccaga agtctgcaat gaagactctg 1860
gctctcctct ttgttggggc aacgggagcg gaagcagagg ctggcgggtg aaagaaaggt 1920
ggtaagaaga agggttcttc tttccagact gtgtcggctc tcttcaggga gaatttgaat 1980
aagctgatga ccaacttgag gagcactcac cccactttg tgcggtgcat catccccaat 2040
gaaactaaaa ctcttggtgc catggagcat gagcttgtcc tgcatcagct gaggtgtaac 2100
gggtgtctgg aaggcatccg catctgcagg aaaggcttcc caagcagaat cttttatgca 2160
gacttcaaac agagatacaa ggtgttaaata gcaagtgcta tccctgaagg acaattcatc 2220
gatagcaaga aggcttcaga gaagctcctg ggggtccattg acattgacca caccagtat 2280
aaatttggtc acaccaaggt ctttttcaaa gctggtcttc tggggctcct agaggagatg 2340
cgagatgaga agctggccca gctgattacc cgaaccagg ccatgtgcag agggttcttg 2400
gcaagagtgg agtaccagaa aatgggtggaa agaagagagt ccatcttctg catccagtac 2460
aatgtccgtg ctttcatgaa tgtcaagcac tggccctgga tgaagctgta tttcaagatc 2520
aaaccctcc tcaaaagtgc agagacagag aaggagatgg ccaacatgaa ggaagaattt 2580
gagaaaacca aagaagagct ggctaagacc gaggcaaaaa ggaaagagct ggaagaaaaa 2640
atggtgactc tgatgcaaga aaaaaatgac ttgcaactcc aggttcaagc tgaagctgac 2700

agcttggctg atgcagagga aaggtgtgac cagctaata aaacccaaat ccagctagaa 2760
gccaaaatca aagaggtgac tgagagagct gaggatgagg aagagatcaa tgctgagctg 2820
acagccaaga agaggaaact ggaggatgaa tgttcagaac tcaagaaaga cattgatgac 2880
cttgagctga cactggccaa ggttgagaag gagaacatg ccacagaaaa caaggtgaaa 2940
aacctcacag aagagatggc gggctctggat gaaaccattg ctaagctgac caaggagaag 3000
aaggctctcc aggaggccca ccagcagacc ctggatgacc tgcaggcaga ggaggacaaa 3060
gtcaacaccc tgaccaaagc taaaatcaaa cttgaacaac aagtggatga tcttgaagga 3120
tctttggaac aagaaaagaa aatccggatg gatctagaaa gagcaaagag aaaactagag 3180
ggagacctaa aattggctca agaatccgca atggatatag aaaatgacaa acaacaactt 3240
gatgaaaagc ttaaaaagaa agagtttgaa atgagcggc tgcaaagcaa gattgaagat 3300
gaacaagccc ttggtatgca gctgcagaag aaaatcaagg agttacaagc ccgcattgag 3360
gagctggagg aggaaatcga ggcagagcgg gcctcccggg ccaaagcaga gaagcagcgc 3420
tctgatctct cccgggagct ggaggagatc agtgagaggc tggaagaagc cgggtggggcc 3480
acctcggccc agattgagat gaacaagaag cgggaagctg agttccagaa aatgcgagc 3540
gacctggagg aggccaccct acagcatgag gccacggcgg ccaccctgag gaagaagcat 3600
gcagatagtg tggccgagct tggggagcag attgacaacc tgcagcgagt gaagcagaag 3660
ctggagaagg agaagagtga gatgaagatg gagatcgatg accttgctag taacatggag 3720
actgtctcca aagccaaggg aaaccttgaa aagatgtgcc gcgctctaga agatcaactg 3780
agtgaatta agaccaagga agaggagcag cagcggctga tcaatgacct cacagcacag 3840
agagcgcgcc tgcaaacaga atcaggtgaa tattcacgcc agctagatga aaaggacaca 3900
ctagtttcac agctctcgag gggcaaacia gcctttactc aacagattga ggaactgaaa 3960
aggcaacttg aagaggagat aaaggccaag agtgccctgg cacatgccct gcagtcctcc 4020
cgccatgact gtgacctgct gcgggaacag tatgaggagg agcaggaagc caaggccgag 4080
ctacagagag caatgtccaa ggccaacagt gaggttgccc agtggaggac caaatatgag 4140
acagatgcca tccagcgcac agaggagctg gaggaggcca agaagaagct ggctcagcgt 4200

ctgcaggatg ctgaggaaca tgtagaagct gtgaatgcc aatgtgcttc ccttgagaag 4260
acgaagcaga ggctccagaa tgaagttgag gacctcatga ttgatgttga gaggacaaat 4320
gctgcctgtg ccgccctgga caaaaagcaa aggaactttg ataagatcct ggcagaatgg 4380
aaacagaagt gtgaagaaac tcatgctgaa cttgaagctt ctcaaaagga atcccgctca 4440
ctcagcacag aactatittaa gattaagaat gcttatgagg aatctttaga ccaacttgaa 4500
accttgaaac gggaaaataa gaatctgcag caggagattt ctgatctcac tgaacagatt 4560
gcagaaggag gaaagcgc atcatgaactg gaaaaaataa agaagcaagt tgagcaagaa 4620
aagtctgaac ttcaggctgc cttagaggag gcagaggcat ctcttgaaca tgaagaggga 4680
aagatcctgc gcatccagct tgagttgaac caagtcaagt ctgaggttga taggaaaatt 4740
gctgaaaaag atgaggaaat tgaccagatg aagagaaacc acattagaat cgtggagtcc 4800
atgcagagca cactggatgc tgagatcagg agcaggaatg atgccattag gctcaagaag 4860
aagatggagg gagacctcaa tgaaatggaa atccagctga accatgcaa ccgcatggct 4920
gctgaggccc tgaggaacta taggaacacc caagccatcc tcaaggatac ccagctccac 4980
ctagatgatg ctctccggag ccaagaggac ctgaaggaac agctggctat ggtggagcgc 5040
agagccaacc tgctgcaggc tgagatcgag gaactacgag ccactctgga acagacggag 5100
aggagcagga aaatcgcaga acaggagctc ctggatgcca gtgaacgtgt tcagctcctg 5160
cacaccaga acaccagcct gatcaacacc aagaagaagc tggagacaga catttcccaa 5220
atccaggagg agatggaaga catcatccag gaagcccgc atgcagaaga gaaggccaag 5280
aaggccatca ctgatgctgc catgatggct gaggagctga agaaggaaca ggacaccagc 5340
gcccatctgg agcggatgaa gaagaacttg gaacagacgg tgaaggacct gcagcatcgt 5400
ctggatgagg ctgagcagct ggccctgaag ggtgggaaga agcagatcca gaaactggag 5460
gccagggttc gtgaacttga aggtgaagtt gaaagtgaac agaagcgcaa tgttgaagct 5520
gtcaagggtc tacgcaaaca tgagagaaaa gtgaaggaac tcacttacca aactgaggaa 5580
gaccgcaaga atattctcag gctgcaggac ctggtggaca agctgcaagc aaaggtgaaa 5640
tcctacaaga gacaagctga agaagcggag gaacaatcca acgtcaacct ctccaaattc 5700

cggaggatcc agcacgagct ggaggaggcc gaggaaaggg ctgacattgc tgagtcccag 5760
 gtcaacaagc tgagggtgaa gagcagggag gttcacacaa aaatcataag tgaagagtaa 5820
 tttatctaac tgctgaaagg tgaccaaaga aatgcacaaa atgtgaaaat ctttgtcact 5880
 ccattttgta cttatgactt ttggagataa aaaatttatt tgcca 5925

<210> 6

<211> 1939

<212> PRT

<213> Homo sapiens .

<400> 6

Met Ser Ser Asp Ser Glu Met Ala Ile Phe Gly Glu Ala Ala Pro Phe
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Ser Glu Arg Glu Arg Ile Glu Ala Gln Asn Lys Pro Phe
 20 25 30

Asp Ala Lys Thr Ser Val Phe Val Val Asp Pro Lys Glu Ser Phe Val
 35 40 45

Lys Ala Thr Val Gln Ser Arg Glu Gly Gly Lys Val Thr Ala Lys Thr
 50 55 60

Glu Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Lys Asp Asp Gln Val Phe Pro Met
 65 70 75 80

Asn Pro Pro Lys Tyr Asp Lys Ile Glu Asp Met Ala Met Met Thr His
 85 90 95

Leu His Glu Pro Ala Val Leu Tyr Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Ala Ala
 100 105 110

Trp Met Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Thr Val Asn Pro
 115 120 125

Tyr Lys Trp Leu Pro Val Tyr Asn Ala Glu Val Val Thr Ala Tyr Arg
 130 135 140

Gly Lys Lys Arg Gln Glu Ala Pro Pro His Ile Phe Ser Ile Ser Asp
145 150 155 160

Asn Ala Tyr Gln Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Asn Gln Ser Ile Leu
165 170 175

Ile Thr Gly Glu Ser Gly Ala Gly Lys Thr Val Asn Thr Lys Arg Val
180 185 190

Ile Gln Tyr Phe Ala Thr Ile Ala Val Thr Gly Glu Lys Lys Lys Glu
195 200 205

Glu Val Thr Ser Gly Lys Met Gln Gly Thr Leu Glu Asp Gln Ile Ile
210 215 220

Ser Ala Asn Pro Leu Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala Lys Thr Val Arg
225 230 235 240

Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg Ile His Phe Gly
245 250 255

Thr Thr Gly Lys Leu Ala Ser Ala Asp Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu
260 265 270

Lys Ser Arg Val Thr Phe Gln Leu Lys Ala Glu Arg Ser Tyr His Ile
275 280 285

Phe Tyr Gln Ile Met Ser Asn Lys Lys Pro Asp Leu Ile Glu Met Leu
290 295 300

Leu Ile Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Tyr Ala Phe Val Ser Gln Gly Glu
305 310 315 320

Ile Thr Val Pro Ser Ile Asp Asp Gln Glu Glu Leu Met Ala Thr Asp
325 330 335

Ser Ala Ile Glu Ile Leu Gly Phe Thr Ser Asp Glu Arg Val Ser Ile
340 345 350

Tyr Lys Leu Thr Gly Ala Val Met His Tyr Gly Asn Met Lys Phe Lys
355 360 365

Gln Lys Gln Arg Glu Glu Gln Ala Glu Pro Asp Gly Thr Glu Val Ala
370 375 380

Asp Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Asn Leu Asn Ser Ala Asp Leu Leu Lys
385 390 395 400

Ala Leu Cys Tyr Pro Arg Val Lys Val Gly Asn Glu Tyr Val Thr Lys
405 410 415

Gly Gln Thr Val Gln Gln Val Tyr Asn Ala Val Gly Ala Leu Ala Lys
420 425 430

Ala Val Tyr Asp Lys Met Phe Leu Trp Met Val Thr Arg Ile Asn Gln
435 440 445

Gln Leu Asp Thr Lys Gln Pro Arg Gln Tyr Phe Ile Gly Val Leu Asp
450 455 460

Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Phe Asn Ser Leu Glu Gln Leu Cys
465 470 475 480

Ile Asn Phe Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Phe Phe Asn His His Met
485 490 495

Phe Val Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Ile Glu Trp Thr
500 505 510

Phe Ile Asp Phe Gly Met Asp Leu Ala Ala Cys Ile Glu Leu Ile Glu
515 520 525

Lys Pro Met Gly Ile Phe Ser Ile Leu Glu Glu Glu Cys Met Phe Pro
530 535 540

Lys Ala Thr Asp Thr Ser Phe Lys Asn Lys Leu Tyr Glu Gln His Leu
545 550 555 560

Gly Lys Ser Asn Asn Phe Gln Lys Pro Lys Pro Ala Lys Gly Lys Pro
565 570 575

Glu Ala His Phe Ser Leu Ile His Tyr Ala Gly Thr Val Asp Tyr Asn
580 585 590

Ile Ala Gly Trp Leu Asp Lys Asn Lys Asp Pro Leu Asn Glu Thr Val
595 600 605

Val Gly Leu Tyr Gln Lys Ser Ala Met Lys Thr Leu Ala Leu Leu Phe
610 615 620

Val Gly Ala Thr Gly Ala Glu Ala Glu Ala Gly Gly Gly Lys Lys Gly
625 630 635 640

Gly Lys Lys Lys Gly Ser Ser Phe Gln Thr Val Ser Ala Leu Phe Arg
645 650 655

Glu Asn Leu Asn Lys Leu Met Thr Asn Leu Arg Ser Thr His Pro His
660 665 670

Phe Val Arg Cys Ile Ile Pro Asn Glu Thr Lys Thr Pro Gly Ala Met
675 680 685

Glu His Glu Leu Val Leu His Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu
690 695 700

Gly Ile Arg Ile Cys Arg Lys Gly Phe Pro Ser Arg Ile Leu Tyr Ala
705 710 715 720

Asp Phe Lys Gln Arg Tyr Lys Val Leu Asn Ala Ser Ala Ile Pro Glu
725 730 735

Gly Gln Phe Ile Asp Ser Lys Lys Ala Ser Glu Lys Leu Leu Gly Ser
740 745 750

Ile Asp Ile Asp His Thr Gln Tyr Lys Phe Gly His Thr Lys Val Phe
755 760 765

Phe Lys Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu Glu Glu Met Arg Asp Glu Lys
770 775 780

Leu Ala Gln Leu Ile Thr Arg Thr Gln Ala Met Cys Arg Gly Phe Leu
785 790 795 800

Ala Arg Val Glu Tyr Gln Lys Met Val Glu Arg Arg Glu Ser Ile Phe
805 810 815

Cys Ile Gln Tyr Asn Val Arg Ala Phe Met Asn Val Lys His Trp Pro
820 825 830

Trp Met Lys Leu Tyr Phe Lys Ile Lys Pro Leu Leu Lys Ser Ala Glu
835 840 845

Thr Glu Lys Glu Met Ala Asn Met Lys Glu Glu Phe Glu Lys Thr Lys
850 855 860

Glu Glu Leu Ala Lys Thr Glu Ala Lys Arg Lys Glu Leu Glu Glu Lys
865 870 875 880

Met Val Thr Leu Met Gln Glu Lys Asn Asp Leu Gln Leu Gln Val Gln
885 890 895

Ala Glu Ala Asp Ser Leu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Cys Asp Gln Leu
900 905 910

Ile Lys Thr Lys Ile Gln Leu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Val Thr Glu
915 920 925

Arg Ala Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asn Ala Glu Leu Thr Ala Lys Lys
930 935 940

Arg Lys Leu Glu Asp Glu Cys Ser Glu Leu Lys Lys Asp Ile Asp Asp
945 950 955 960

Leu Glu Leu Thr Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Lys His Ala Thr Glu
965 970 975

Asn Lys Val Lys Asn Leu Thr Glu Glu Met Ala Gly Leu Asp Glu Thr
980 985 990

Ile Ala Lys Leu Thr Lys Glu Lys Lys Ala Leu Gln Glu Ala His Gln
995 1000 1005

Gln Thr Leu Asp Asp Leu Gln Ala Glu Glu Asp Lys Val Asn Thr
1010 1015 1020

Leu Thr Lys Ala Lys Ile Lys Leu Glu Gln Gln Val Asp Asp Leu
1025 1030 1035

Glu Gly Ser Leu Glu Gln Glu Lys Lys Ile Arg Met Asp Leu Glu
1040 1045 1050

Arg Ala Lys Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Glu
1055 1060 1065

Ser Ala Met Asp Ile Glu Asn Asp Lys Gln Gln Leu Asp Glu Lys
1070 1075 1080

Leu Lys Lys Lys Glu Phe Glu Met Ser Gly Leu Gln Ser Lys Ile
1085 1090 1095

Glu Asp Glu Gln Ala Leu Gly Met Gln Leu Gln Lys Lys Ile Lys
1100 1105 1110

Glu Leu Gln Ala Arg Ile Glu Glu Leu Glu Glu Glu Ile Glu Ala
1115 1120 1125

Glu Arg Ala Ser Arg Ala Lys Ala Glu Lys Gln Arg Ser Asp Leu
1130 1135 1140

Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Ser Glu Arg Leu Glu Glu Ala Gly
1145 1150 1155

Gly Ala Thr Ser Ala Gln Ile Glu Met Asn Lys Lys Arg Glu Ala
1160 1165 1170

Glu Phe Gln Lys Met Arg Arg Asp Leu Glu Glu Ala Thr Leu Gln
1175 1180 1185

His Glu Ala Thr Ala Ala Thr Leu Arg Lys Lys His Ala Asp Ser
1190 1195 1200

Val Ala Glu Leu Gly Glu Gln Ile Asp Asn Leu Gln Arg Val Lys
1205 1210 1215

Gln Lys Leu Glu Lys Glu Lys Ser Glu Met Lys Met Glu Ile Asp
1220 1225 1230

Asp Leu Ala Ser Asn Met Glu Thr Val Ser Lys Ala Lys Gly Asn
1235 1240 1245

Leu Glu Lys Met Cys Arg Ala Leu Glu Asp Gln Leu Ser Glu Ile
1250 1255 1260

Lys Thr Lys Glu Glu Glu Gln Gln Arg Leu Ile Asn Asp Leu Thr
1265 1270 1275

Ala Gln Arg Ala Arg Leu Gln Thr Glu Ser Gly Glu Tyr Ser Arg
1280 1285 1290

Gln Leu Asp Glu Lys Asp Thr Leu Val Ser Gln Leu Ser Arg Gly
1295 1300 1305

Lys Gln Ala Phe Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Lys Arg Gln Leu
1310 1315 1320

Glu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Ser Ala Leu Ala His Ala Leu Gln
1325 1330 1335

Ser Ser Arg His Asp Cys Asp Leu Leu Arg Glu Gln Tyr Glu Glu
1340 1345 1350

Glu Gln Glu Ala Lys Ala Glu Leu Gln Arg Ala Met Ser Lys Ala
1355 1360 1365

Asn Ser Glu Val Ala Gln Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Thr Asp Ala
1370 1375 1380

Ile Gln Arg Thr Glu Glu Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys Leu Ala
1385 1390 1395

Gln Arg Leu Gln Asp Ala Glu Glu His Val Glu Ala Val Asn Ala
1400 1405 1410

Lys Cys Ala Ser Leu Glu Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gln Asn Glu
1415 1420 1425

Val Glu Asp Leu Met Ile Asp Val Glu Arg Thr Asn Ala Ala Cys
1430 1435 1440

Ala Ala Leu Asp Lys Lys Gln Arg Asn Phe Asp Lys Ile Leu Ala
1445 1450 1455

Glu Trp Lys Gln Lys Cys Glu Glu Thr His Ala Glu Leu Glu Ala
1460 1465 1470

Ser Gln Lys Glu Ser Arg Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Ile
1475 1480 1485

Lys Asn Ala Tyr Glu Glu Ser Leu Asp Gln Leu Glu Thr Leu Lys
1490 1495 1500

Arg Glu Asn Lys Asn Leu Gln Gln Glu Ile Ser Asp Leu Thr Glu
1505 1510 1515

Gln Ile Ala Glu Gly Gly Lys Arg Ile His Glu Leu Glu Lys Ile
1520 1525 1530

Lys Lys Gln Val Glu Gln Glu Lys Ser Glu Leu Gln Ala Ala Leu
1535 1540 1545

Glu Glu Ala Glu Ala Ser Leu Glu His Glu Glu Gly Lys Ile Leu
1550 1555 1560

Arg Ile Gln Leu Glu Leu Asn Gln Val Lys Ser Glu Val Asp Arg
1565 1570 1575

Lys Ile Ala Glu Lys Asp Glu Glu Ile Asp Gln Met Lys Arg Asn
1580 1585 1590

His Ile Arg Ile Val Glu Ser Met Gln Ser Thr Leu Asp Ala Glu
1595 1600 1605

Ile Arg Ser Arg Asn Asp Ala Ile Arg Leu Lys Lys Lys Met Glu
1610 1615 1620

Gly Asp Leu Asn Glu Met Glu Ile Gln Leu Asn His Ala Asn Arg
1625 1630 1635

Met Ala Ala Glu Ala Leu Arg Asn Tyr Arg Asn Thr Gln Ala Ile
1640 1645 1650

Leu Lys Asp Thr Gln Leu His Leu Asp Asp Ala Leu Arg Ser Gln
1655 1660 1665

Glu Asp Leu Lys Glu Gln Leu Ala Met Val Glu Arg Arg Ala Asn
1670 1675 1680

Leu Leu Gln Ala Glu Ile Glu Glu Leu Arg Ala Thr Leu Glu Gln
1685 1690 1695

Thr Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Glu Gln Glu Leu Leu Asp Ala
1700 1705 1710

Ser Glu Arg Val Gln Leu Leu His Thr Gln Asn Thr Ser Leu Ile
1715 1720 1725

Asn Thr Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Ile Ser Gln Ile Gln Gly
1730 1735 1740

Glu Met Glu Asp Ile Ile Gln Glu Ala Arg Asn Ala Glu Glu Lys
1745 1750 1755

Ala Lys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Met Met Ala Glu Glu Leu
1760 1765 1770

Lys Lys Glu Gln Asp Thr Ser Ala His Leu Glu Arg Met Lys Lys
1775 1780 1785

Asn Leu Glu Gln Thr Val Lys Asp Leu Gln His Arg Leu Asp Glu
1790 1795 1800

Ala Glu Gln Leu Ala Leu Lys Gly Gly Lys Lys Gln Ile Gln Lys
1805 1810 1815

Leu Glu Ala Arg Val Arg Glu Leu Glu Gly Glu Val Glu Ser Glu
1820 1825 1830

Gln Lys Arg Asn Val Glu Ala Val Lys Gly Leu Arg Lys His Glu
1835 1840 1845

Arg Lys Val Lys Glu Leu Thr Tyr Gln Thr Glu Glu Asp Arg Lys
1850 1855 1860

Asn Ile Leu Arg Leu Gln Asp Leu Val Asp Lys Leu Gln Ala Lys
1865 1870 1875

Val Lys Ser Tyr Lys Arg Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Gln Ser
1880 1885 1890

Asn Val Asn Leu Ser Lys Phe Arg Arg Ile Gln His Glu Leu Glu
1895 1900 1905

Glu Ala Glu Glu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Ser Gln Val Asn Lys
1910 1915 1920

Leu Arg Val Lys Ser Arg Glu Val His Thr Lys Ile Ile Ser Glu
1925 1930 1935

Glu

<210> 7
<211> 2633
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (38)..(2584)
<223>

<400> 7
ccgcggcaag aacatccctc ccagccagca gattaca atg ctg caa act aag gat 55
Met Leu Gln Thr Lys Asp
1 5

ctc atc tgg act ttg ttt ttc ctg gga act gca gtt tct ctg cag gtg 103
Leu Ile Trp Thr Leu Phe Phe Leu Gly Thr Ala Val Ser Leu Gln Val
10 15 20

gat att gtt ccc agc cag ggg gag atc agc gtt gga gag tcc aaa ttc 151
Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser Val Gly Glu Ser Lys Phe
25 30 35

ttc tta tgc caa gtg gca gga gat gcc aaa gat aaa gac atc tcc tgg 199
Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys Asp Lys Asp Ile Ser Trp
40 45 50

ttc tcc ccc aat gga gaa aag ctc acc cca aac cag cag cgg atc tca 247
Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro Asn Gln Gln Arg Ile Ser
55 60 65 70

gtg gtg tgg aat gat gat tcc tcc tcc acc ctc acc atc tat aac gcc Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr Leu Thr Ile Tyr Asn Ala 75 80 85	295
aac atc gac gac gcc ggc att tac aag tgt gtg gtt aca ggc gag gat Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys Val Val Thr Gly Glu Asp 90 95 100	343
ggc agt gag tca gag gcc acc gtc aac gtg aag atc ttt cag aag ctc Gly Ser Glu Ser Glu Ala Thr Val Asn Val Lys Ile Phe Gln Lys Leu 105 110 115	391
atg ttc aag aat gcg cca acc cca cag gag ttc cgg gag ggg gaa gat Met Phe Lys Asn Ala Pro Thr Pro Gln Glu Phe Arg Glu Gly Glu Asp 120 125 130	439
gcc gtg att gtg tgt gat gtg gtc agc tcc ctc cca cca acc atc atc Ala Val Ile Val Cys Asp Val Val Ser Ser Leu Pro Pro Thr Ile Ile 135 140 145 150	487
tgg aaa cac aaa ggc cga gat gtc atc ctg aaa aaa gat gtc cga ttc Trp Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys Lys Asp Val Arg Phe 155 160 165	535
ata gtc ctg tcc aac aac tac ctg cag atc cgg ggc atc aag aaa aca Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr Leu Gln Ile Arg Gly Ile Lys Lys Thr 170 175 180	583
gat gag ggc act tat cgc tgt gag ggc aga atc ctg gca cgg ggg gag Asp Glu Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Gly Arg Ile Leu Ala Arg Gly Glu 185 190 195	631
atc aac ttc aag gac att cag gtc att gtg aat gtg cca cct acc atc Ile Asn Phe Lys Asp Ile Gln Val Ile Val Asn Val Pro Pro Thr Ile 200 205 210	679
cgg gcc agg cag aat att gtg aat gcc acc gcc aac ctc ggc cag tcc Arg Ala Arg Gln Asn Ile Val Asn Ala Thr Ala Asn Leu Gly Gln Ser 215 220 225 230	727
gtc acc ctg gtg tgc gat gcc gaa cgg ttc cca gag ccc acc atg agc Val Thr Leu Val Cys Asp Ala Glu Arg Phe Pro Glu Pro Thr Met Ser 235 240 245	775
tgg aca aag gat ggg gaa cag ata gag caa gag gaa gac gat gag aag Trp Thr Lys Asp Gly Glu Gln Ile Glu Gln Glu Glu Asp Asp Glu Lys 250 255 260	823
tac atc ttc agc gac gat agt tcc cag ctg acc atc aaa aag gtg gat	871

Tyr Ile Phe Ser Asp Asp Ser Ser Gln Leu Thr Ile Lys Lys Val Asp	
265 270 275	
aag aac gac gag gct gag tac atc tgc att gct gag aac aag gct ggc	919
Lys Asn Asp Glu Ala Glu Tyr Ile Cys Ile Ala Glu Asn Lys Ala Gly	
280 285 290	
gag cag gat gcg acc atc cac ctc aaa gtc ttt gca aaa ccc aaa atc	967
Glu Gln Asp Ala Thr Ile His Leu Lys Val Phe Ala Lys Pro Lys Ile	
295 300 305 310	
aca tat gta gag aac cag act gcc atg gaa tta gag gag cag gtc act	1015
Thr Tyr Val Glu Asn Gln Thr Ala Met Glu Leu Glu Glu Gln Val Thr	
315 320 325	
ctt acc tgt gaa gcc tcc gga gac ccc att ccc tcc atc acc tgg agg	1063
Leu Thr Cys Glu Ala Ser Gly Asp Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Arg	
330 335 340	
act tct acc cgg aac atc agc agc gaa gaa aag act ctg gat ggg cac	1111
Thr Ser Thr Arg Asn Ile Ser Ser Glu Glu Lys Thr Leu Asp Gly His	
345 350 355	
atg gtg gtg cgt agc cat gcc cgt gtg tgc tgc ctg acc ctg aag agc	1159
Met Val Val Arg Ser His Ala Arg Val Ser Ser Leu Thr Leu Lys Ser	
360 365 370	
atc cag tac act gat gcc gga gag tac atc tgc acc gcc agc aac acc	1207
Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Thr Ala Ser Asn Thr	
375 380 385 390	
atc ggc cag gac tcc cag tcc atg tac ctt gaa gtg caa tat gcc cca	1255
Ile Gly Gln Asp Ser Gln Ser Met Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Ala Pro	
395 400 405	
aag cta cag ggc cct gtg gct gtg tac act tgg gag ggg aac cag gtg	1303
Lys Leu Gln Gly Pro Val Ala Val Tyr Thr Trp Glu Gly Asn Gln Val	
410 415 420	
aac atc acc tgc gag gta ttt gcc tat ccc agt gcc acg atc tca tgg	1351
Asn Ile Thr Cys Glu Val Phe Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Ile Ser Trp	
425 430 435	
ttt cgg gat ggc cag ctg ctg cca agc tcc aat tac agc aat atc aag	1399
Phe Arg Asp Gly Gln Leu Leu Pro Ser Ser Asn Tyr Ser Asn Ile Lys	
440 445 450	
atc tac aac acc ccc tct gcc agc tat ctg gag gtg acc cca gac tct	1447
Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu Glu Val Thr Pro Asp Ser	
455 460 465 470	

gag aat gat ttt ggg aac tac aac tgt act gca gtg aac cgc att ggg 1495
 Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile Gly
 475 480 485

cag gag tcc ttc gaa ttc atc ctt gtt caa gca gac acc ccc tct tca 1543
 Gln Glu Ser Phe Glu Phe Ile Leu Val Gln Ala Asp Thr Pro Ser Ser
 490 495 500

cca tcc atc gac cag gtg gag cca tac tcc agc aca gcc cag gtg cag 1591
 Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser Ser Thr Ala Gln Val Gln
 505 510 515

ttt gat gaa cca gag gcc aca ggt ggg gtg ccc atc ctc aaa tac aaa 1639
 Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val Pro Ile Leu Lys Tyr Lys
 520 525 530

gct gag tgg aga gca gtg ggt gaa gaa gta tgg cat tcc aag tgg tat 1687
 Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val Trp His Ser Lys Trp Tyr
 535 540 545 550

gat gcc aag gaa gcc agc atg gag ggc atc gtc acc atc gtg ggc ctg 1735
 Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile Val Thr Ile Val Gly Leu
 555 560 565

aag ccc gaa aca acg tac gcc gta agg ctg gcg gcg ctc aat ggc aaa 1783
 Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu Ala Ala Leu Asn Gly Lys
 570 575 580

ggg ctg ggt gag atc agc gcg gcc tcc gag ttc aag acg cag cca gtc 1831
 Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu Phe Lys Thr Gln Pro Val
 585 590 595

caa ggg gaa ccc agt gca cct aag ctc gaa ggg cag atg gga gag gat 1879
 Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu Gly Gln Met Gly Glu Asp
 600 605 610

gga aac tct att aaa gtg aac ctg atc aag cag gat gac ggc ggc tcc 1927
 Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys Gln Asp Asp Gly Gly Ser
 615 620 625 630

ccc atc aga cac tat ctg gtc agg tac cga gcg ctc tcc tcc gag tgg 1975
 Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Ser Ser Glu Trp
 635 640 645

aaa cca gag atc agg ctc ccg tct ggc agt gac cac gtc atg ctg aag 2023
 Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp His Val Met Leu Lys
 650 655 660

tcc ctg gac tgg aat gct gag tat gag gtc tac gtg gtg gct gag aac 2071

Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val Tyr Val Val Ala Glu Asn
 665 670 675

cag caa gga aaa tcc aag gcg gct cat ttt gtg ttc agg acc tcg gcc 2119
 Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe Val Phe Arg Thr Ser Ala
 680 685 690

cag ccc aca gcc atc cca gcc aac ggc agc ccc acc tca ggc ctg agc 2167
 Gln Pro Thr Ala Ile Pro Ala Asn Gly Ser Pro Thr Ser Gly Leu Ser
 695 700 705 710

acc ggg gcc atc gtg ggc atc ctc atc gtc atc ttc gtc ctg ctc ctg 2215
 Thr Gly Ala Ile Val Gly Ile Leu Ile Val Ile Phe Val Leu Leu Leu
 715 720 725

gtg gtt gtg gac atc acc tgc tac ttc ctg aac aag tgt ggc ctg ttc 2263
 Val Val Val Asp Ile Thr Cys Tyr Phe Leu Asn Lys Cys Gly Leu Phe
 730 735 740

atg tgc att gcg gtc aac ctg tgt gga aaa gcc ggg ccc ggg gcc aag 2311
 Met Cys Ile Ala Val Asn Leu Cys Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ala Lys
 745 750 755

ggc aag gac atg gag gag ggc aag gcc gcc ttc tcg aaa gat gag tcc 2359
 Gly Lys Asp Met Glu Glu Gly Lys Ala Ala Phe Ser Lys Asp Glu Ser
 760 765 770

aag gag ccc atc gtg gag gtt cga acg gag gag gag agg acc cca aac 2407
 Lys Glu Pro Ile Val Glu Val Arg Thr Glu Glu Glu Arg Thr Pro Asn
 775 780 785 790

cat gat gga ggg aaa cac aca gag ccc aac gag acc acg cca ctg acg 2455
 His Asp Gly Gly Lys His Thr Glu Pro Asn Glu Thr Thr Pro Leu Thr
 795 800 805

gag ccc gag aag ggc ccc gta gaa gca aag cca gag tgc cag gag aca 2503
 Glu Pro Glu Lys Gly Pro Val Glu Ala Lys Pro Glu Cys Gln Glu Thr
 810 815 820

gaa acg aag cca gcg cca gcc gaa gtc aag acg gtc ccc aat gac gcc 2551
 Glu Thr Lys Pro Ala Pro Ala Glu Val Lys Thr Val Pro Asn Asp Ala
 825 830 835

aca cag aca aag gag aac gag agc aaa gca tga tgggtgaaga gaaccgagca 2604
 Thr Gln Thr Lys Glu Asn Glu Ser Lys Ala
 840 845

aagatcaaaa taataaagtga cacagcagc 2633

<210> 8
 <211> 848
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Leu Gln Thr Lys Asp Leu Ile Trp Thr Leu Phe Phe Leu Gly Thr
 1 5 10 15

Ala Val Ser Leu Gln Val Asp Ile Val Pro Ser Gln Gly Glu Ile Ser
 20 25 30

Val Gly Glu Ser Lys Phe Phe Leu Cys Gln Val Ala Gly Asp Ala Lys
 35 40 45

Asp Lys Asp Ile Ser Trp Phe Ser Pro Asn Gly Glu Lys Leu Thr Pro
 50 55 60

Asn Gln Gln Arg Ile Ser Val Val Trp Asn Asp Asp Ser Ser Ser Thr
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Tyr Asn Ala Asn Ile Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Lys Cys
 85 90 95

Val Val Thr Gly Glu Asp Gly Ser Glu Ser Glu Ala Thr Val Asn Val
 100 105 110

Lys Ile Phe Gln Lys Leu Met Phe Lys Asn Ala Pro Thr Pro Gln Glu
 115 120 125

Phe Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Val Cys Asp Val Val Ser Ser
 130 135 140

Leu Pro Pro Thr Ile Ile Trp Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu
 145 150 155 160

Lys Lys Asp Val Arg Phe Ile Val Leu Ser Asn Asn Tyr Leu Gln Ile
 165 170 175

Arg Gly Ile Lys Lys Thr Asp Glu Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Gly Arg
180 185 190

Ile Leu Ala Arg Gly Glu Ile Asn Phe Lys Asp Ile Gln Val Ile Val
195 200 205

Asn Val Pro Pro Thr Ile Arg Ala Arg Gln Asn Ile Val Asn Ala Thr
210 215 220

Ala Asn Leu Gly Gln Ser Val Thr Leu Val Cys Asp Ala Glu Arg Phe
225 230 235 240

Pro Glu Pro Thr Met Ser Trp Thr Lys Asp Gly Glu Gln Ile Glu Gln
245 250 255

Glu Glu Asp Asp Glu Lys Tyr Ile Phe Ser Asp Asp Ser Ser Gln Leu
260 265 270

Thr Ile Lys Lys Val Asp Lys Asn Asp Glu Ala Glu Tyr Ile Cys Ile
275 280 285

Ala Glu Asn Lys Ala Gly Glu Gln Asp Ala Thr Ile His Leu Lys Val
290 295 300

Phe Ala Lys Pro Lys Ile Thr Tyr Val Glu Asn Gln Thr Ala Met Glu
305 310 315 320

Leu Glu Glu Gln Val Thr Leu Thr Cys Glu Ala Ser Gly Asp Pro Ile
325 330 335

Pro Ser Ile Thr Trp Arg Thr Ser Thr Arg Asn Ile Ser Ser Glu Glu
340 345 350

Lys Thr Leu Asp Gly His Met Val Val Arg Ser His Ala Arg Val Ser
355 360 365

Ser Leu Thr Leu Lys Ser Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Gly Glu Tyr Ile

370

375

380

Cys Thr Ala Ser Asn Thr Ile Gly Gln Asp Ser Gln Ser Met Tyr Leu
385 390 395 400

Glu Val Gln Tyr Ala Pro Lys Leu Gln Gly Pro Val Ala Val Tyr Thr
405 410 415

Trp Glu Gly Asn Gln Val Asn Ile Thr Cys Glu Val Phe Ala Tyr Pro
420 425 430

Ser Ala Thr Ile Ser Trp Phe Arg Asp Gly Gln Leu Leu Pro Ser Ser
435 440 445

Asn Tyr Ser Asn Ile Lys Ile Tyr Asn Thr Pro Ser Ala Ser Tyr Leu
450 455 460

Glu Val Thr Pro Asp Ser Glu Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Cys Thr
465 470 475 480

Ala Val Asn Arg Ile Gly Gln Glu Ser Phe Glu Phe Ile Leu Val Gln
485 490 495

Ala Asp Thr Pro Ser Ser Pro Ser Ile Asp Gln Val Glu Pro Tyr Ser
500 505 510

Ser Thr Ala Gln Val Gln Phe Asp Glu Pro Glu Ala Thr Gly Gly Val
515 520 525

Pro Ile Leu Lys Tyr Lys Ala Glu Trp Arg Ala Val Gly Glu Glu Val
530 535 540

Trp His Ser Lys Trp Tyr Asp Ala Lys Glu Ala Ser Met Glu Gly Ile
545 550 555 560

Val Thr Ile Val Gly Leu Lys Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Val Arg Leu
565 570 575

Ala Ala Leu Asn Gly Lys Gly Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Ser Glu
580 585 590

Phe Lys Thr Gln Pro Val Gln Gly Glu Pro Ser Ala Pro Lys Leu Glu
595 600 605

Gly Gln Met Gly Glu Asp Gly Asn Ser Ile Lys Val Asn Leu Ile Lys
610 615 620

Gln Asp Asp Gly Gly Ser Pro Ile Arg His Tyr Leu Val Arg Tyr Arg
625 630 635 640

Ala Leu Ser Ser Glu Trp Lys Pro Glu Ile Arg Leu Pro Ser Gly Ser
645 650 655

Asp His Val Met Leu Lys Ser Leu Asp Trp Asn Ala Glu Tyr Glu Val
660 665 670

Tyr Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala Ala His Phe
675 680 685

Val Phe Arg Thr Ser Ala Gln Pro Thr Ala Ile Pro Ala Asn Gly Ser
690 695 700

Pro Thr Ser Gly Leu Ser Thr Gly Ala Ile Val Gly Ile Leu Ile Val
705 710 715 720

Ile Phe Val Leu Leu Leu Val Val Val Asp Ile Thr Cys Tyr Phe Leu
725 730 735

Asn Lys Cys Gly Leu Phe Met Cys Ile Ala Val Asn Leu Cys Gly Lys
740 745 750

Ala Gly Pro Gly Ala Lys Gly Lys Asp Met Glu Glu Gly Lys Ala Ala
755 760 765

Phe Ser Lys Asp Glu Ser Lys Glu Pro Ile Val Glu Val Arg Thr Glu

770

775

780

Glu Glu Arg Thr Pro Asn His Asp Gly Gly Lys His Thr Glu Pro Asn
 785 790 795 800

Glu Thr Thr Pro Leu Thr Glu Pro Glu Lys Gly Pro Val Glu Ala Lys
 805 810 815

Pro Glu Cys Gln Glu Thr Glu Thr Lys Pro Ala Pro Ala Glu Val Lys
 820 825 830

Thr Val Pro Asn Asp Ala Thr Gln Thr Lys Glu Asn Glu Ser Lys Ala
 835 840 845

<210> 9
 <211> 1692
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens;

<220>
 <221> CDS
 <222> (121)..(1080)
 <223>

<300>
 <308> X56677
 <309> 1991-03-19
 <313> (1)..(1692)

<400> 9
 attcagactg ccagcacttt gctatctaca gccggggctc ccgagcggca gaaagttccg 60

gccactctct gccgcttggg ttgggcgaaa gccaggaccg tgccgcgcca ccgccaggat 120

atg gag cta ctg tcg cca ccg ctc cgc gac gta gac ctg acg gcc ccc 168
 Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15

gac ggc tct ctc tgc tcc ttt gcc aca acg gac gac ttc tat gac gac 216
 Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp
 20 25 30

ccg tgt ttc gac tcc ccg gac ctg cgc ttc ttc gaa gac ctg gac ccg 264
 Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro
 35 40 45

cgc ctg atg cac gtg ggc gcg ctc ctg aaa ccc gaa gag cac tcg cac 312
 Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His
 50 55 60

ttc ccc gcg gcg gtg cac ccg gcc ccg ggc gca cgt gag gac gag cat 360
 Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His
 65 70 75 80

gtg cgc gcg ccc agc ggg cac cac cag gcg ggc cgc tgc cta ctg tgg 408
 Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp
 85 90 95

gcc tgc aag gcg tgc aag cgc aag acc acc aac gcc gac cgc cgc aag 456
 Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys
 100 105 110

gcc gcc acc atg cgc gag cgg cgc cgc ctg agc aaa gta aat gag gcc 504
 Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala
 115 120 125

ttt gag aca ctc aag cgc tgc acg tcg agc aat cca aac cag cgg ttg 552
 Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu
 130 135 140

ccc aag gtg gag atc ctg cgc aac gcc atc cgc tat atc gag ggc ctg 600
 Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu
 145 150 155 160

cag gct ctg ctg cgc gac cag gac gcc gcg ccc cct ggc gca gcc gcc 648
 Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala
 165 170 175

ttc tat gcg ccg ggc ccg ctg ccc ccg ggc cgc ggc ggc gag cac tac 696
 Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His Tyr
 180 185 190

agc ggc gac tcc gac gcg tcc agc ccg cgc tcc aac tgc tcc gac ggc 744
 Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp Gly
 195 200 205

atg atg gac tac agc ggc ccc ccg agc ggc gcc cgg cgg cgg aac tgc 792
 Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn Cys
 210 215 220

tac gaa ggc gcc tac tac aac gag gcg ccc agc gaa ccc agg ccc ggc 840
 Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro Gly
 225 230 235 240

aag agt gcg gcg gtg tcg agc cta gac tac ctg tcc agc atc gtg gag 888

[illegible]

<210>	10
<211>	319
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens;

<400> 10

Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro

1 5 10 15
Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp
20 25 30
Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro
35 40 45
Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His
50 55 60
Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His
65 70 75 80
Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp
85 90 95
Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys
100 105 110
Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala
115 120 125
Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu
130 135 140
Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu
145 150 155 160
Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala
165 170 175
Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His Tyr
180 185 190
Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp Gly
195 200 205

Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn Cys
210 215 220

Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro Gly
225 230 235 240

Lys Ser Ala Ala Val Ser Ser Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Ile Val Glu
245 250 255

Arg Ile Ser Thr Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Ala Asp
260 265 270

Val Pro Ser Glu Ser Pro Pro Arg Arg Gln Glu Ala Ala Ala Pro Ser
275 280 285

Glu Gly Glu Ser Ser Gly Asp Pro Thr Gln Ser Pro Asp Ala Ala Pro
290 295 300

Gln Cys Pro Ala Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ile Tyr Gln Val Leu
305 310 315

<210> 11
<211> 1427
<212> DNA
<213> Homo sapiens;

<220>
<221> CDS
<222> (43)..(810)
<223>

<300>
<308> NM_005593
<309> 2003-04-07
<313> (1)..(1427)

<400> 11
cctctcgctg ccgtccaggt gcaccgcctg cctctcagca gg atg gac gtg atg 54
Met Asp Val Met
1

gat ggc tgc cag ttc tca cct tct gag tac ttc tac gac ggc tcc tgc 102
出証特 2 0 0 4 - 3 0 7 9 2 3 9

Asp Gly Cys Gln Phe Ser Pro Ser Glu Tyr Phe Tyr Asp Gly Ser Cys
 5 10 15 20
 ata ccg tcc ccc gag ggt gaa ttt ggg gac gag ttt gtg ccg cga gtg 150
 Ile Pro Ser Pro Glu Gly Glu Phe Gly Asp Glu Phe Val Pro Arg Val
 25 30 35
 gct gcc ttc gga gcg cac aaa gca gag ctg cag ggc tca gat gag gac 198
 Ala Ala Phe Gly Ala His Lys Ala Glu Leu Gln Gly Ser Asp Glu Asp
 40 45 50
 gag cac gtg cga gcg cct acc ggc cac cac cag gct ggt cac tgc ctc 246
 Glu His Val Arg Ala Pro Thr Gly His His Gln Ala Gly His Cys Leu
 55 60 65
 atg tgg gcc tgc aaa gcc tgc aag agg aag tcc acc acc atg gat cgg 294
 Met Trp Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Ser Thr Thr Met Asp Arg
 70 75 80
 cgg aag gca gcc act atg cgc gag cgg agg cgc ctg aag aag gtc aac 342
 Arg Lys Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Lys Lys Val Asn
 85 90 95 100
 cag gct ttc gaa acc ctc aag agg tgt acc acg acc aac ccc aac cag 390
 Gln Ala Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Thr Thr Asn Pro Asn Gln
 105 110 115
 agg ctg ccc aag gtg gag atc ctc agg aat gcc atc cgc tac atc gag 438
 Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu
 120 125 130
 agc ctg cag gag ttg ctg aga gag cag gtg gag aac tac tat agc ctg 486
 Ser Leu Gln Glu Leu Leu Arg Glu Gln Val Glu Asn Tyr Tyr Ser Leu
 135 140 145
 ccg gga cag agc tgc tcg gag ccc acc agc ccc acc tcc aac tgc tct 534
 Pro Gly Gln Ser Cys Ser Glu Pro Thr Ser Pro Thr Ser Asn Cys Ser
 150 155 160
 gat ggc atg ccc gaa tgt aac agt cct gtc tgg tcc aga aag agc agt 582
 Asp Gly Met Pro Glu Cys Asn Ser Pro Val Trp Ser Arg Lys Ser Ser
 165 170 175 180
 act ttt gac agc atc tac tgt cct gat gta tca aat gta tat gcc aca 630
 Thr Phe Asp Ser Ile Tyr Cys Pro Asp Val Ser Asn Val Tyr Ala Thr
 185 190 195
 gat aaa aac tcc tta tcc agc ttg gat tgc tta tcc aac ata gtg gac 678
 Asp Lys Asn Ser Leu Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser Asn Ile Val Asp
 200 205 210

cgg atc acc tcc tca gag caa cct ggg ttg cct ctc cag gat ctg gct 726
 Arg Ile Thr Ser Ser Glu Gln Pro Gly Leu Pro Leu Gln Asp Leu Ala
 215 220 225
 tct ctc tct cca gtt gcc agc acc gat tca cag cct cga act cca ggg 774
 Ser Leu Ser Pro Val Ala Ser Thr Asp Ser Gln Pro Arg Thr Pro Gly
 230 235 240
 gct tct agt tcc agg ctt atc tat cat gtg cta tga actaattttc 820
 Ala Ser Ser Ser Arg Leu Ile Tyr His Val Leu
 245 250 255
 tgggtctatat gacttcttcc aggagggcct aatacacagg acgaagaagg cttcaaaaag 880
 tcccaaacca agacaacatg tacataaaga tttcttttca gttgtaaatt tgtaaagatt 940
 accttgccac tttataagaa agtgtattta actaaaaagt catcattgca aataatactt 1000
 tcttcttctt tattattctt tgcttagata ttaatacata gttccagtaa tactatttct 1060
 gatagggggc cattgattga gggtagcttg ttcgaatgct taacttatat atacatatat 1120
 atatattata aatattgctc atcaaaatgt ctctgggtgt tagagcttta ttttttctt 1180
 taaaacatta aaacagctga gaatcagtta aatggaattt taaatatatt taactatttc 1240
 ttttctcttt aatccttttag ttatattgta ttaaataaaa atataatact gcctaatagta 1300
 tatattttga tcttttcttg taagaaatgt atcttttaaa tgtaagcaca aaatagtact 1360
 ttgtggatca tttcaagata taagaaattt tggaaattcc accataaata aaatttttta 1420
 ctacaag 1427

<210> 12
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens;

<400> 12

Met Asp Val Met Asp Gly Cys Gln Phe Ser Pro Ser Glu Tyr Phe Tyr
 1 5 10 15

Asp Gly Ser Cys Ile Pro Ser Pro Glu Gly Glu Phe Gly Asp Glu Phe
 20 25 30

Val Pro Arg Val Ala Ala Phe Gly Ala His Lys Ala Glu Leu Gln Gly
35 40 45

Ser Asp Glu Asp Glu His Val Arg Ala Pro Thr Gly His His Gln Ala
50 55 60

Gly His Cys Leu Met Trp Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Ser Thr
65 70 75 80

Thr Met Asp Arg Arg Lys Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu
85 90 95

Lys Lys Val Asn Gln Ala Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Thr Thr
100 105 110

Asn Pro Asn Gln Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile
115 120 125

Arg Tyr Ile Glu Ser Leu Gln Glu Leu Leu Arg Glu Gln Val Glu Asn
130 135 140

Tyr Tyr Ser Leu Pro Gly Gln Ser Cys Ser Glu Pro Thr Ser Pro Thr
145 150 155 160

Ser Asn Cys Ser Asp Gly Met Pro Glu Cys Asn Ser Pro Val Trp Ser
165 170 175

Arg Lys Ser Ser Thr Phe Asp Ser Ile Tyr Cys Pro Asp Val Ser Asn
180 185 190

Val Tyr Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser
195 200 205

Asn Ile Val Asp Arg Ile Thr Ser Ser Glu Gln Pro Gly Leu Pro Leu
210 215 220

Gln Asp Leu Ala Ser Leu Ser Pro Val Ala Ser Thr Asp Ser Gln Pro

aac cag cgg ctg ccc aag gtg gag atc ctg cgc agt gcc atc cag tac 384
 Asn Gln Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Ser Ala Ile Gln Tyr
 115 120 125

 atc gag cgc ctc cag gcc ctg ctc agc tcc ctc aac cag gag gag cgt 432
 Ile Glu Arg Leu Gln Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu Arg
 130 135 140

 gac ctc cgc tac cgg ggc ggg ggc ggg ccc cag cca ggg gtg ccc agc 480
 Asp Leu Arg Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Ser
 145 150 155 160

 gaa tgc agc tct cac agc gcc tcc tgc agt cca gag tgg ggc agt gca 528
 Glu Cys Ser Ser His Ser Ala Ser Cys Ser Pro Glu Trp Gly Ser Ala
 165 170 175

 ctg gag ttc agc gcc aac cca ggg gat cat ctg ctc acg gct gac cct 576
 Leu Glu Phe Ser Ala Asn Pro Gly Asp His Leu Leu Thr Ala Asp Pro
 180 185 190

 aca gat gcc cac aac ctg cac tcc ctc acc tcc atc gtg gac agc atc 624
 Thr Asp Ala His Asn Leu His Ser Leu Thr Ser Ile Val Asp Ser Ile
 195 200 205

 aca gtg gaa gat gtg tct gtg gcc ttc cca gat gaa acc atg ccc aac 672
 Thr Val Glu Asp Val Ser Val Ala Phe Pro Asp Glu Thr Met Pro Asn
 210 215 220

 tag 675

<210> 14
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens;

<400> 14

Met Glu Leu Tyr Glu Thr Ser Pro Tyr Phe Tyr Gln Glu Pro Arg Phe
 1 5 10 15

Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Leu Pro Val His Leu Gln Gly Phe Glu Pro
 20 25 30

Pro Gly Tyr Glu Arg Thr Glu Leu Thr Leu Ser Pro Glu Ala Pro Gly
 35 40 45

Pro Leu Glu Asp Lys Gly Leu Gly Thr Pro Glu His Cys Pro Gly Gln
50 55 60

Cys Leu Pro Trp Ala Cys Lys Val Cys Lys Arg Lys Ser Val Ser Val
65 70 75 80

Asp Arg Arg Arg Ala Ala Thr Leu Arg Glu Lys Arg Arg Leu Lys Lys
85 90 95

Val Asn Glu Ala Phe Glu Ala Leu Lys Arg Ser Thr Leu Leu Asn Pro
100 105 110

Asn Gln Arg Leu Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Ser Ala Ile Gln Tyr
115 120 125

Ile Glu Arg Leu Gln Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu Arg
130 135 140

Asp Leu Arg Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Pro Gln Pro Gly Val Pro Ser
145 150 155 160

Glu Cys Ser Ser His Ser Ala Ser Cys Ser Pro Glu Trp Gly Ser Ala
165 170 175

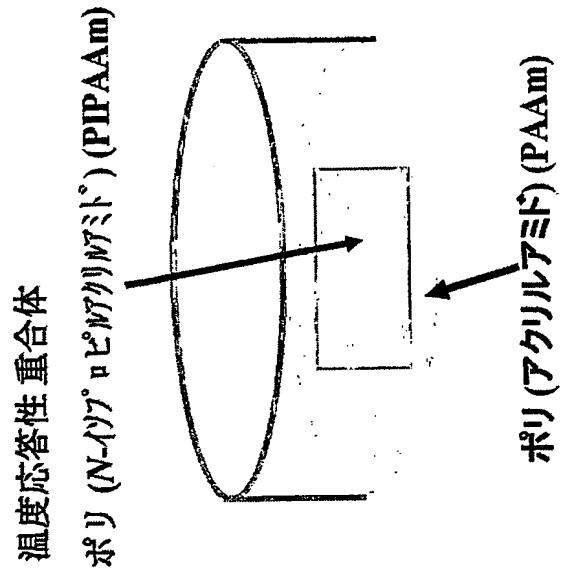
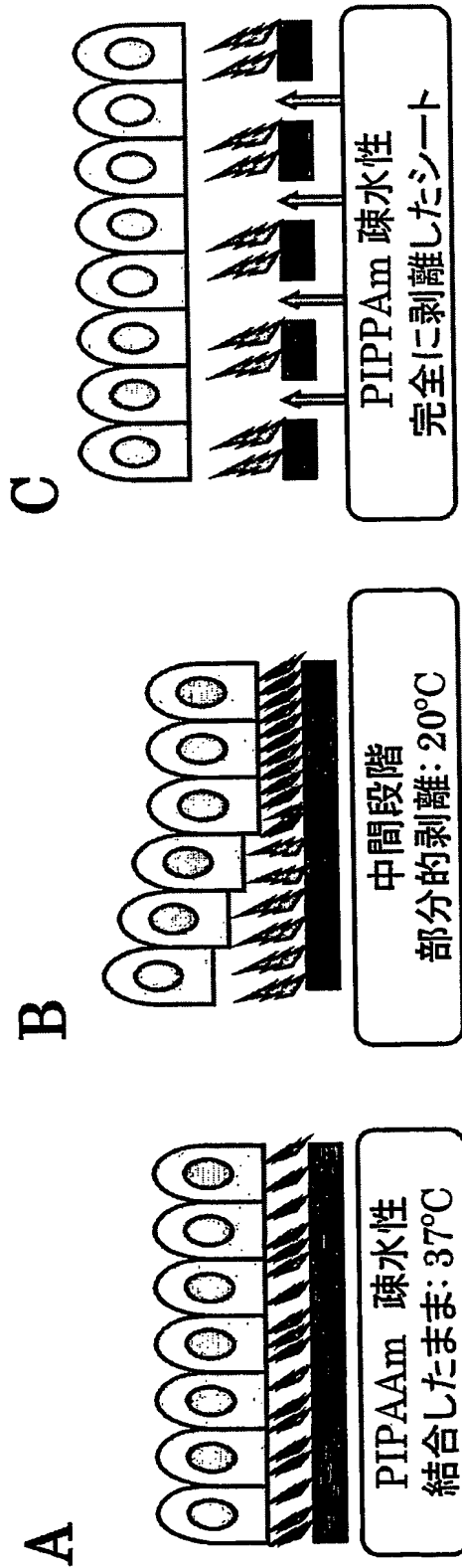
Leu Glu Phe Ser Ala Asn Pro Gly Asp His Leu Leu Thr Ala Asp Pro
180 185 190

Thr Asp Ala His Asn Leu His Ser Leu Thr Ser Ile Val Asp Ser Ile
195 200 205

Thr Val Glu Asp Val Ser Val Ala Phe Pro Asp Glu Thr Met Pro Asn
210 215 220

細胞シート構築

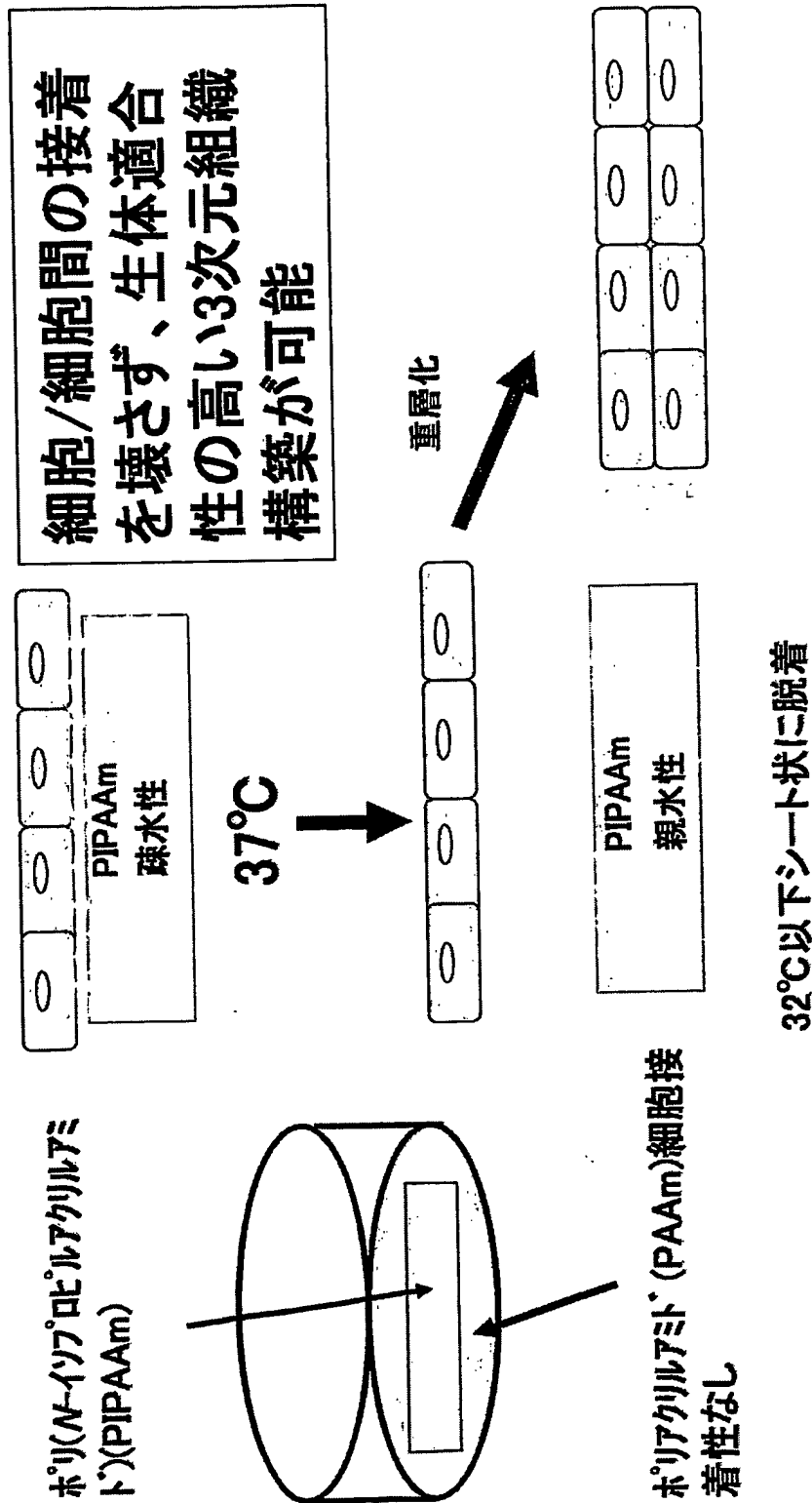
【書類名】 図面
【図1A】



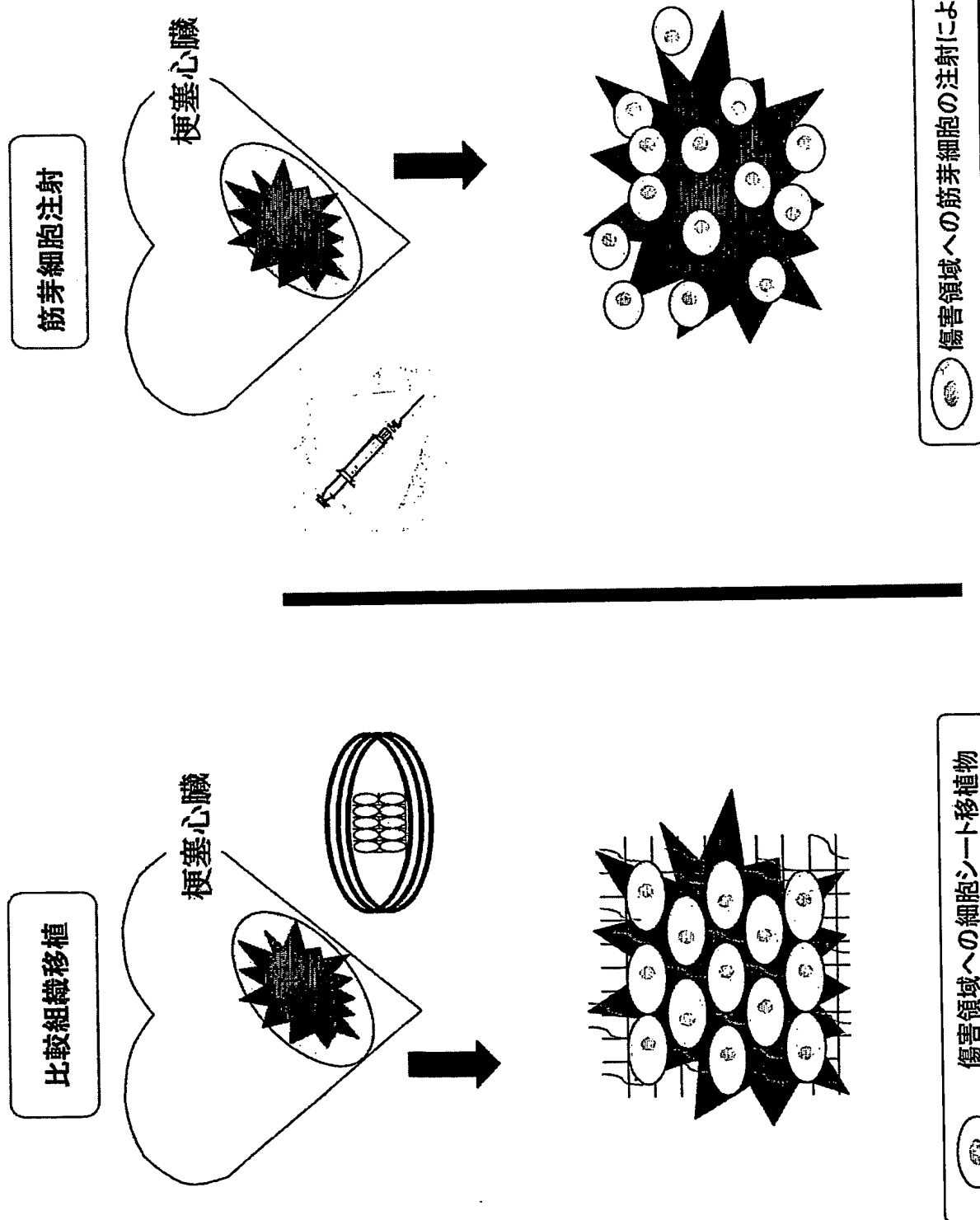
サイズ例: 1.11±0.05cm² 広さ
50.2±6.0μm厚さ

【図 1 B】

温度応答性培養皿

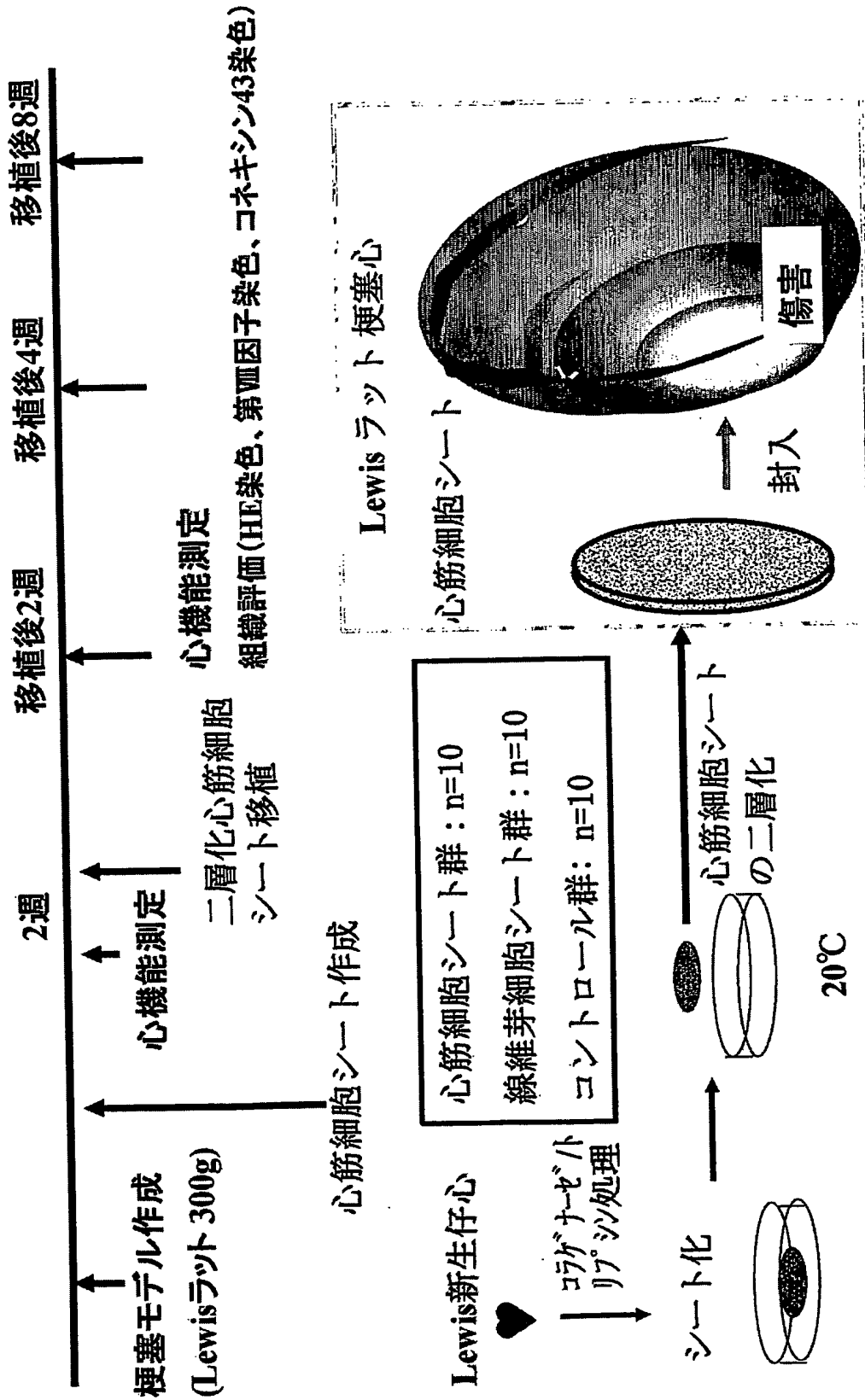


【図 2】



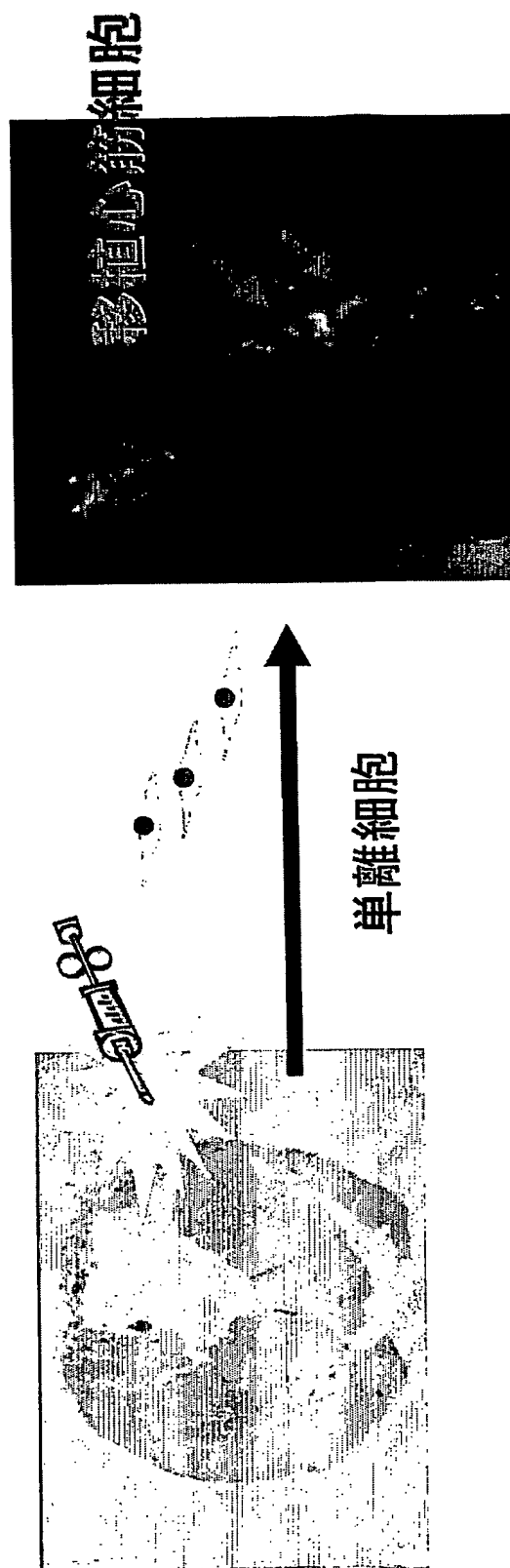
【図3】

実験プロトコール



【図 4】

細胞移植による心筋再生治療



【図 5】

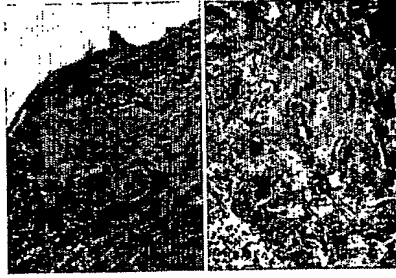
組織移植の問題点

足場を用いた心筋グRAFT

足場内の移植細胞の配向性、細胞間接着性

足場自体の生体における変化: 炎症の惹起

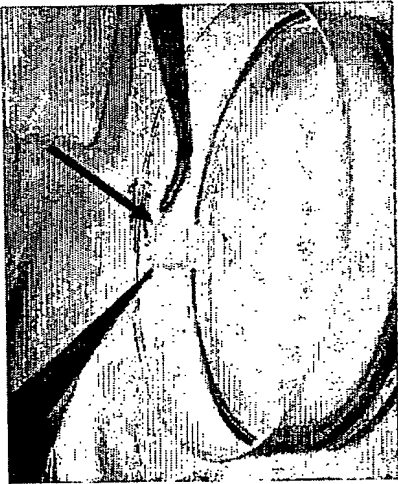
足場のレスピエント心への生着性の問題



足場を用いない、生体適合性の高い心筋グRAFTの開発

【図 6】

心筋細胞シートへの移植



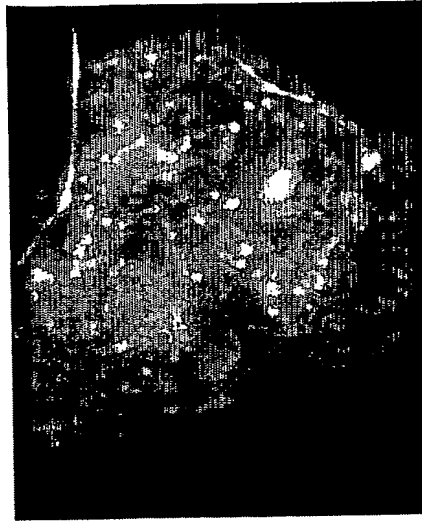
心筋細胞シート



ラット梗塞モデルへの移植



インビトロ



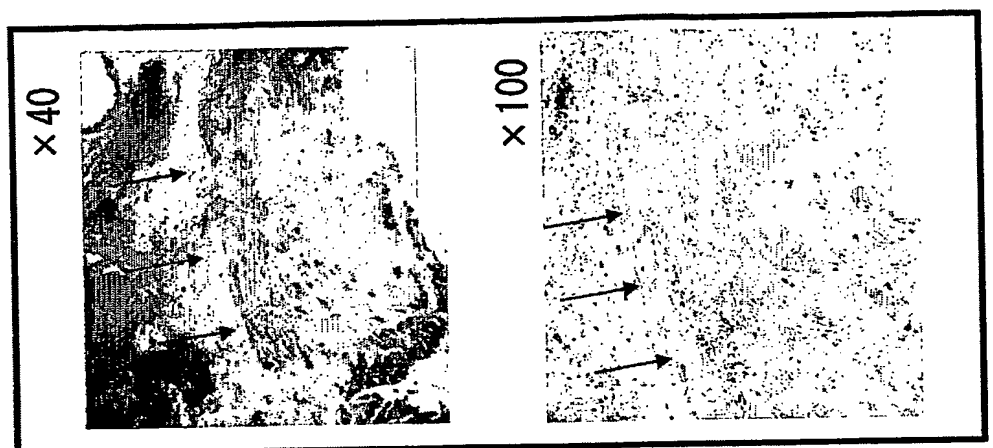
インビボ

GFP ラット新生仔心筋細胞シート移植

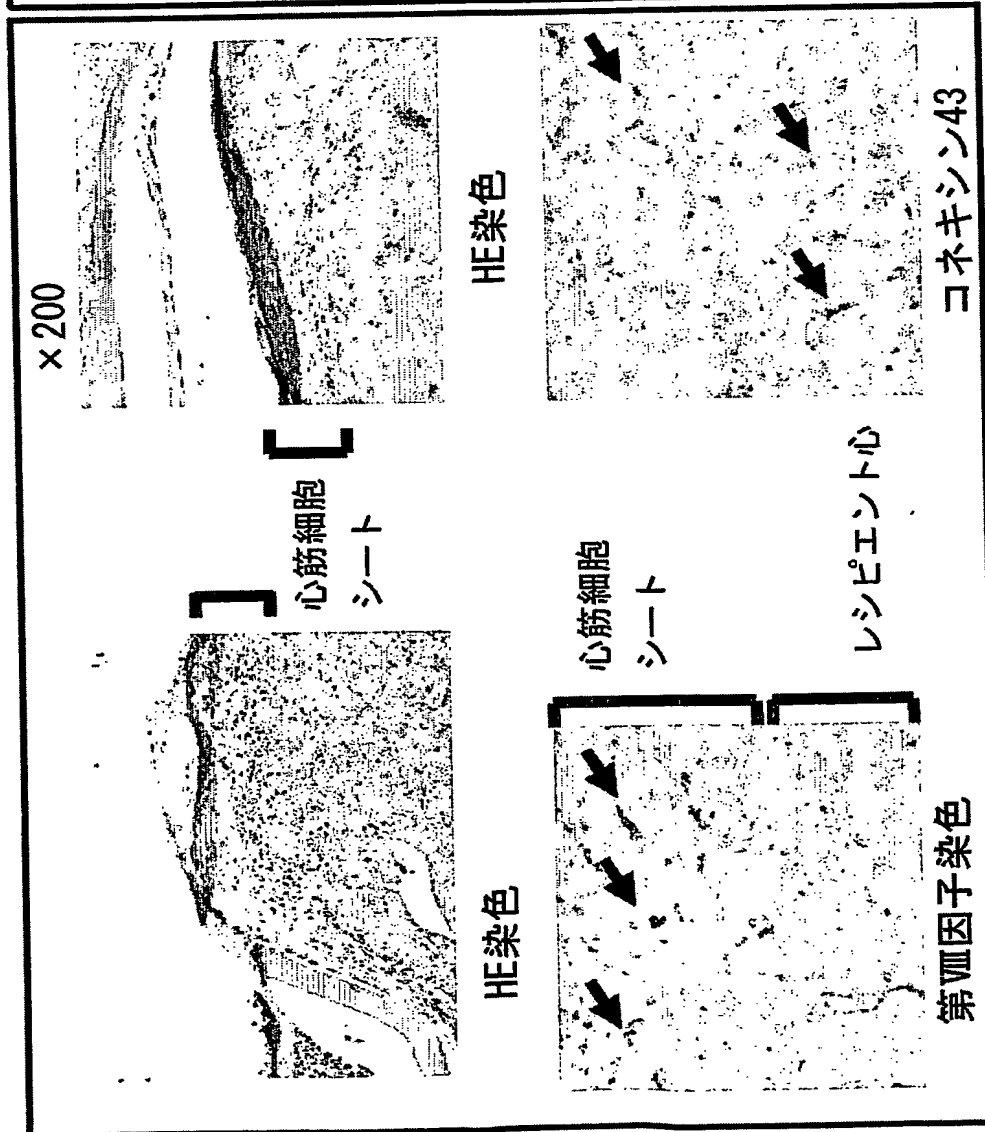
【図7】

組織

移植後8週

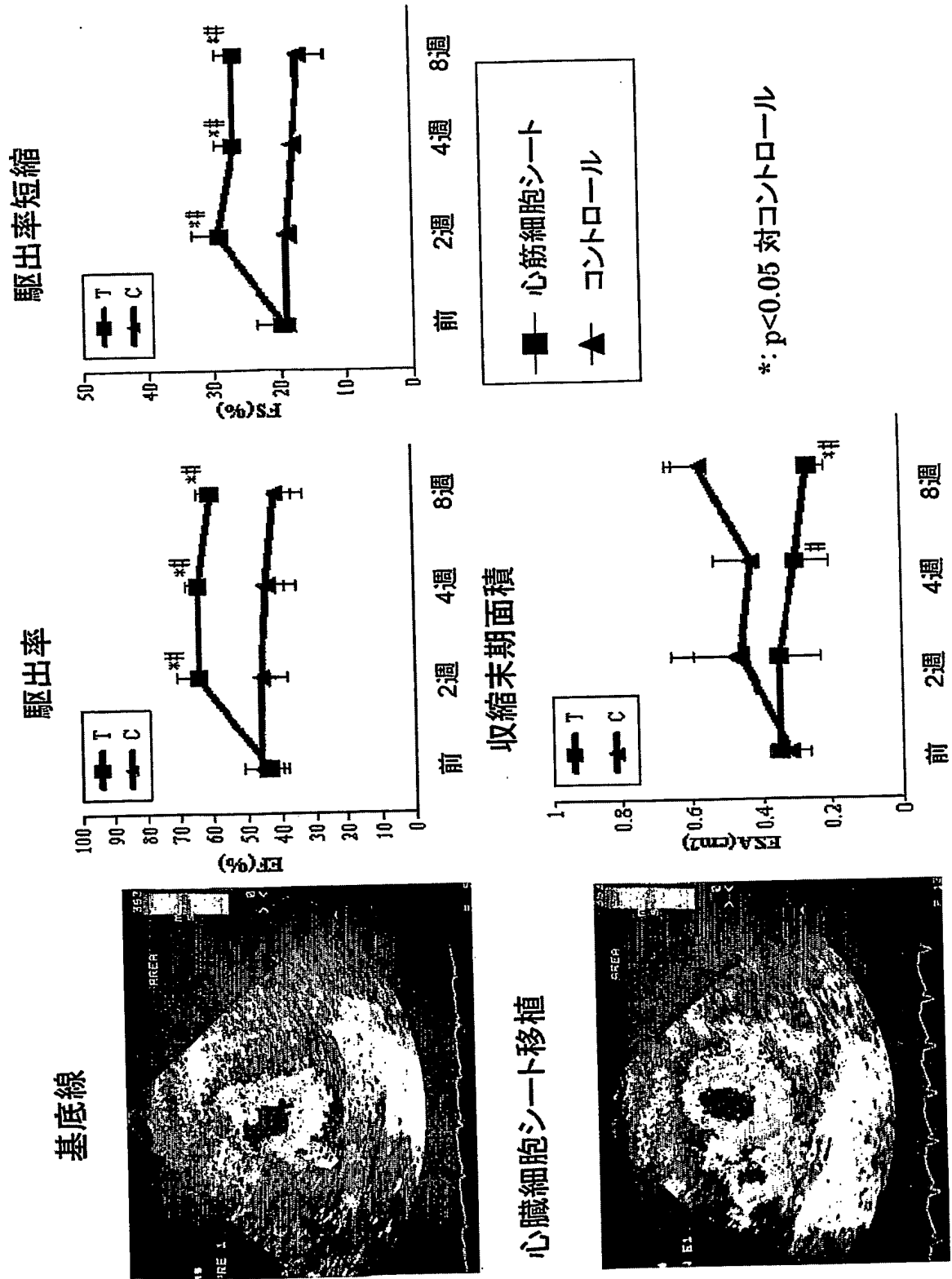


移植後2週



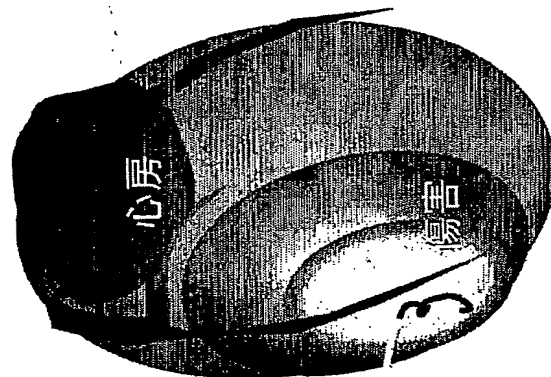
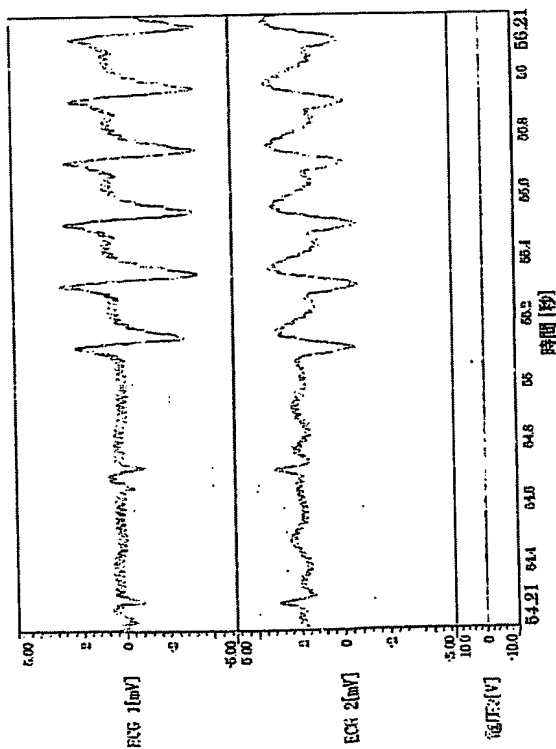
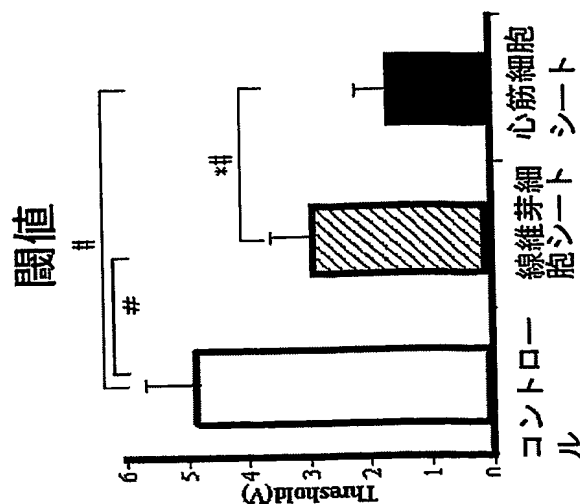
【図9】

心機能評価-2



【図10】

電気生理学的評価

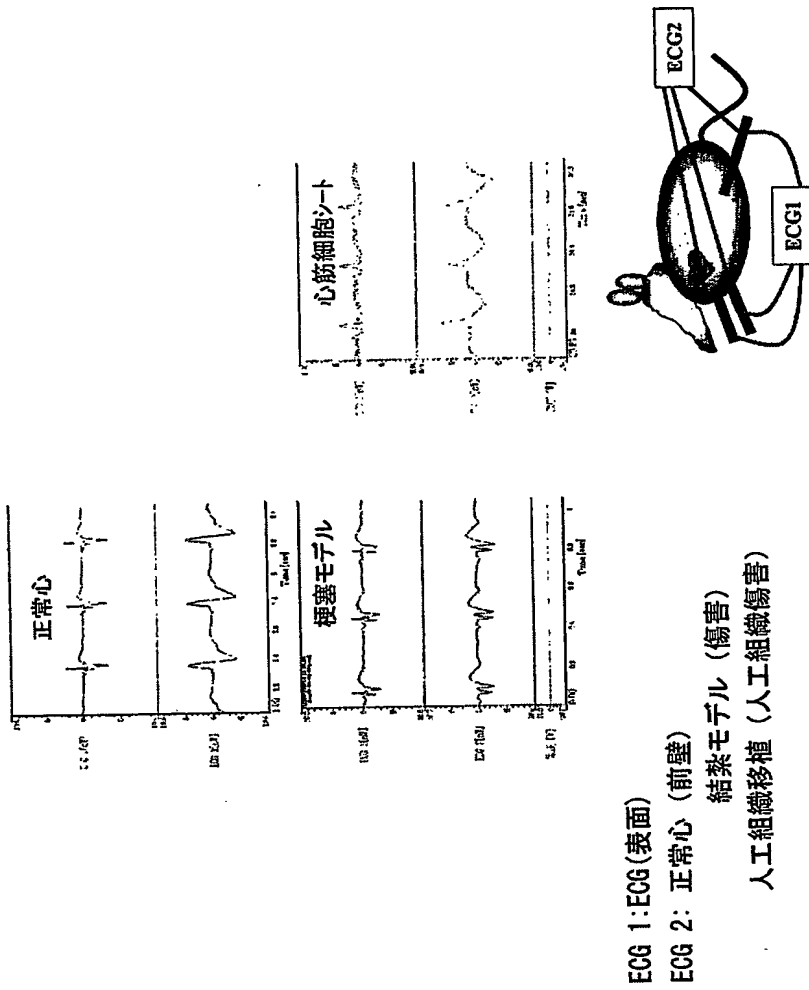


刺激 (300bpm)

シート移植部位埋め
込み電極

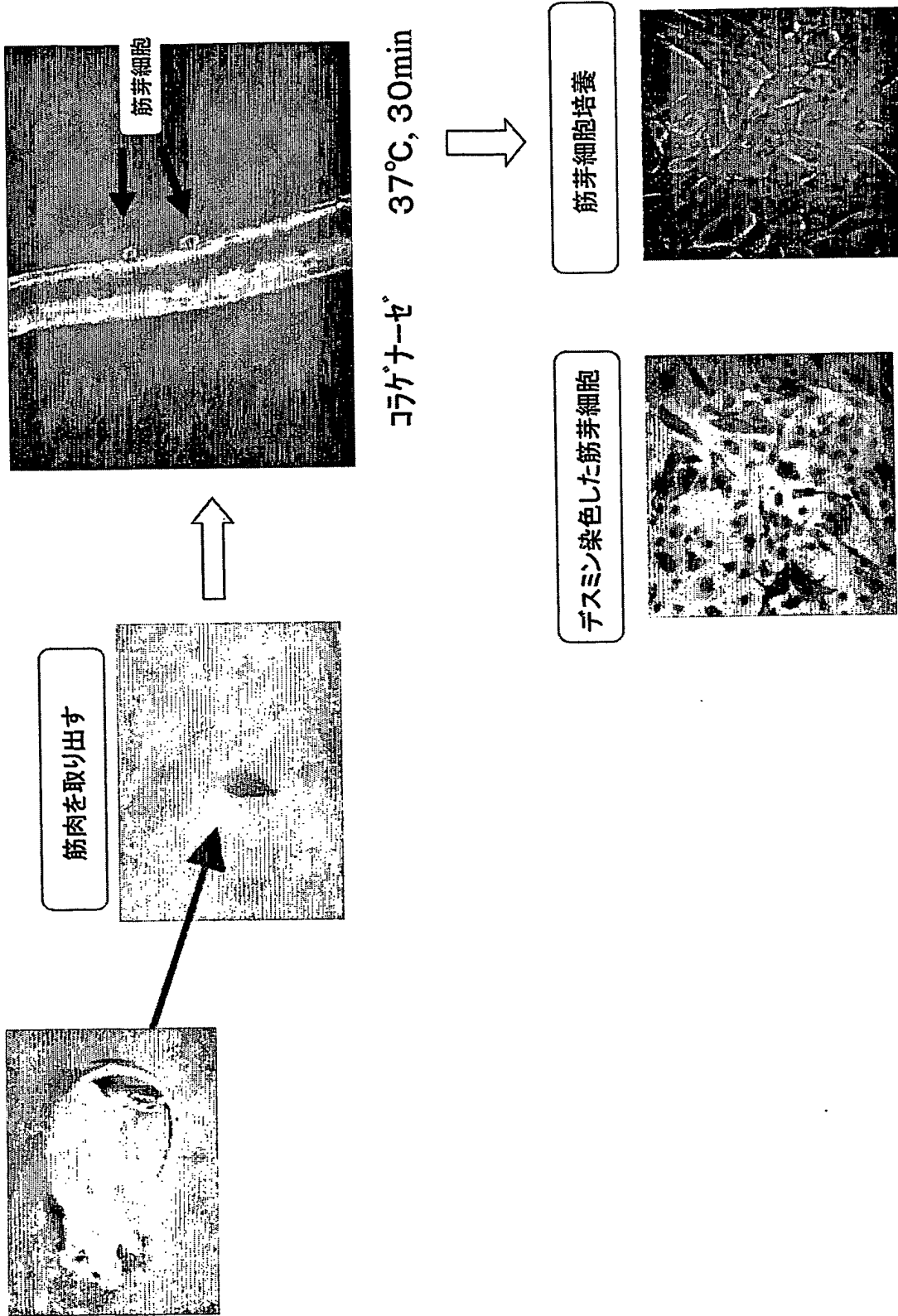
【図 11】

電気生理学の評価



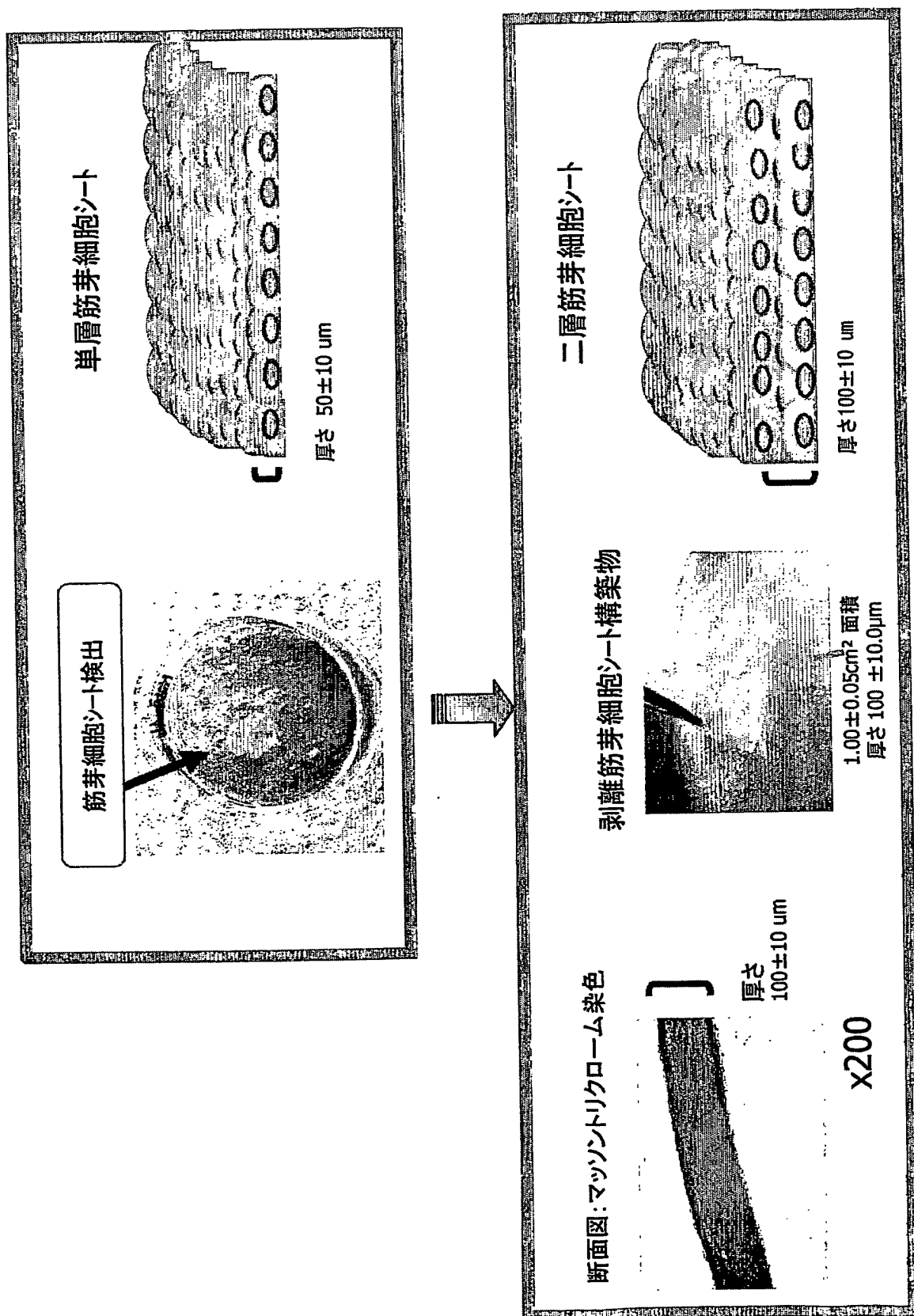
【図 12】

筋芽細胞の分離および培養



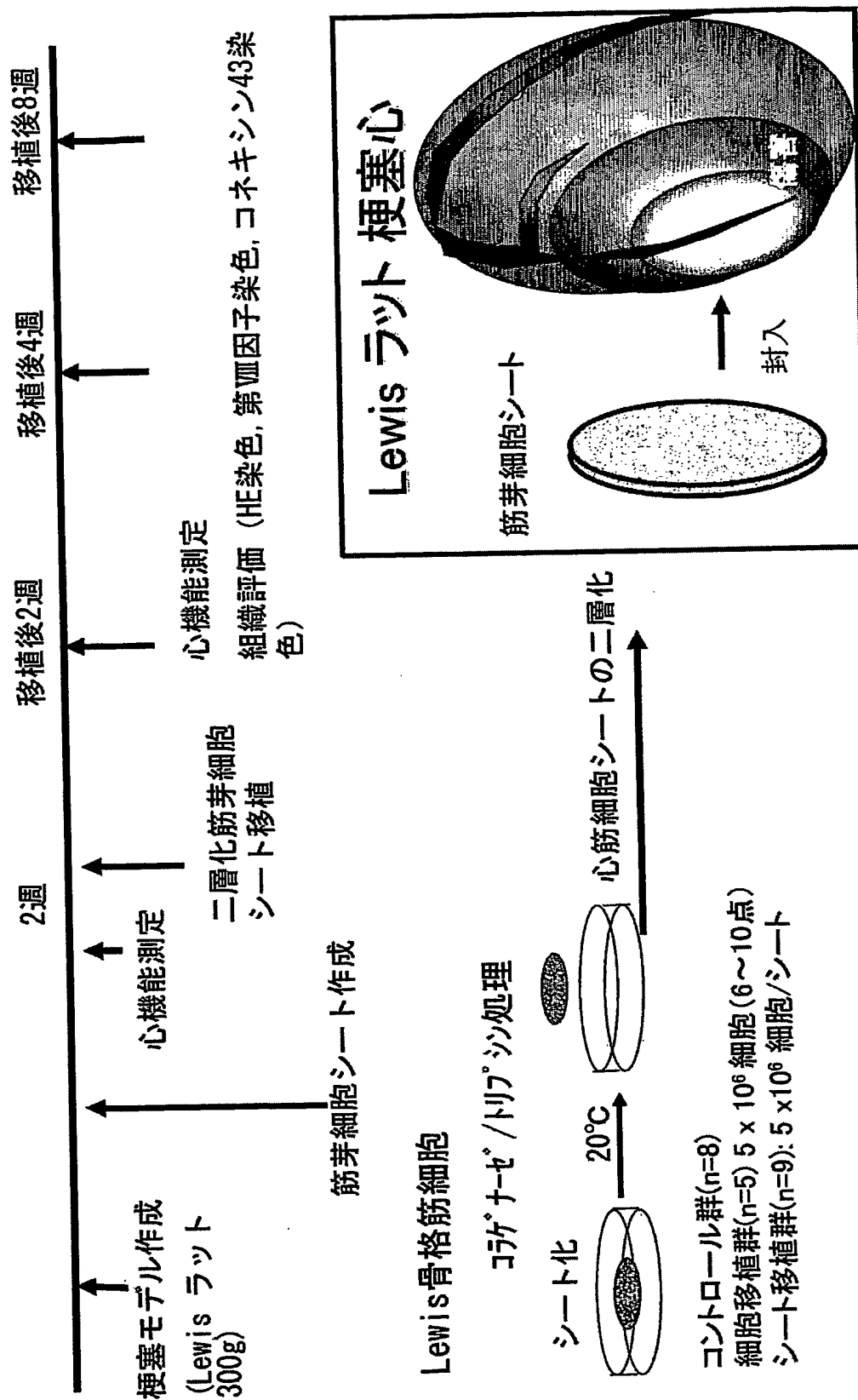
【図 13】

方法: 筋芽細胞シート構築物



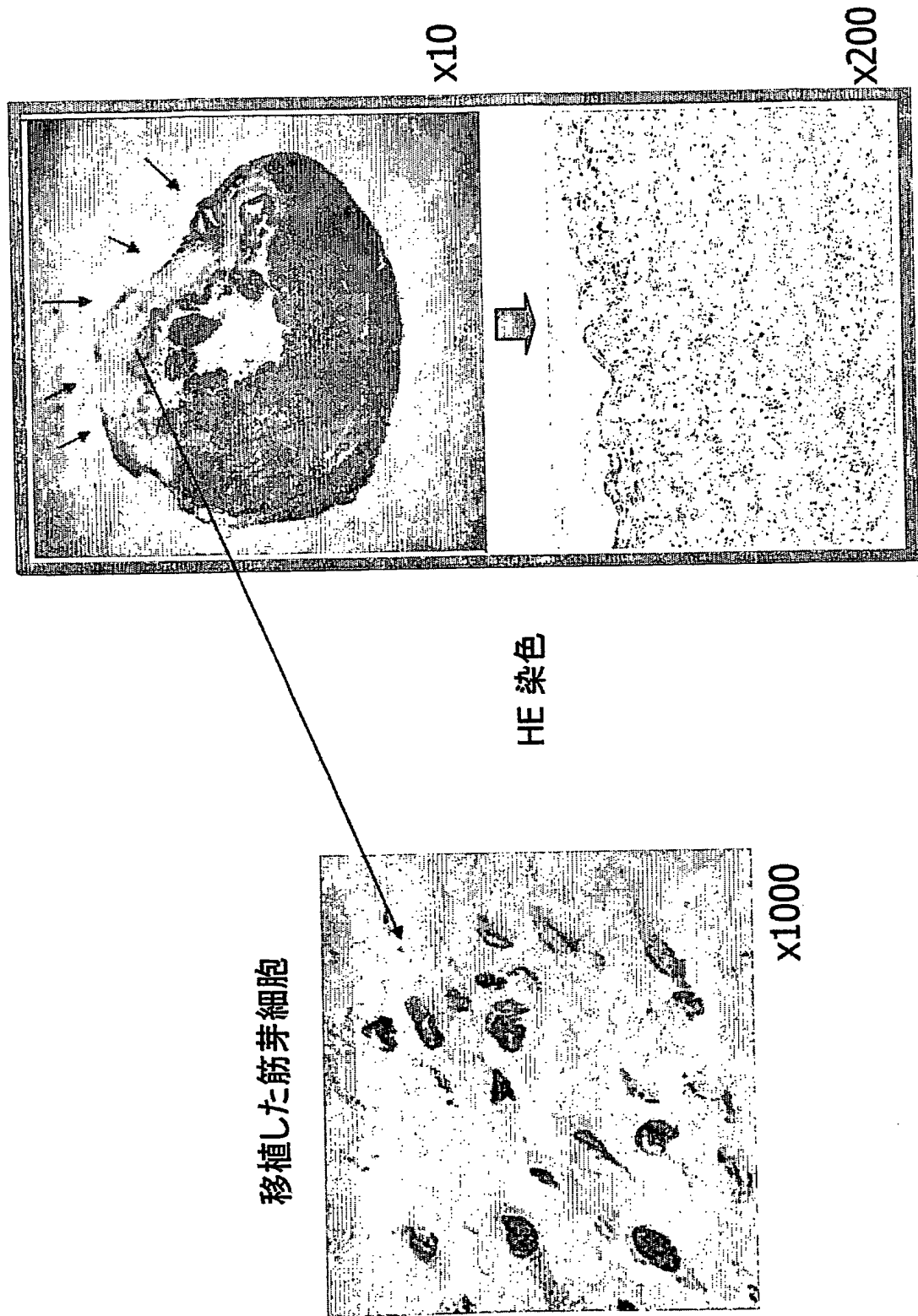
【図 14】

実験プロトコール



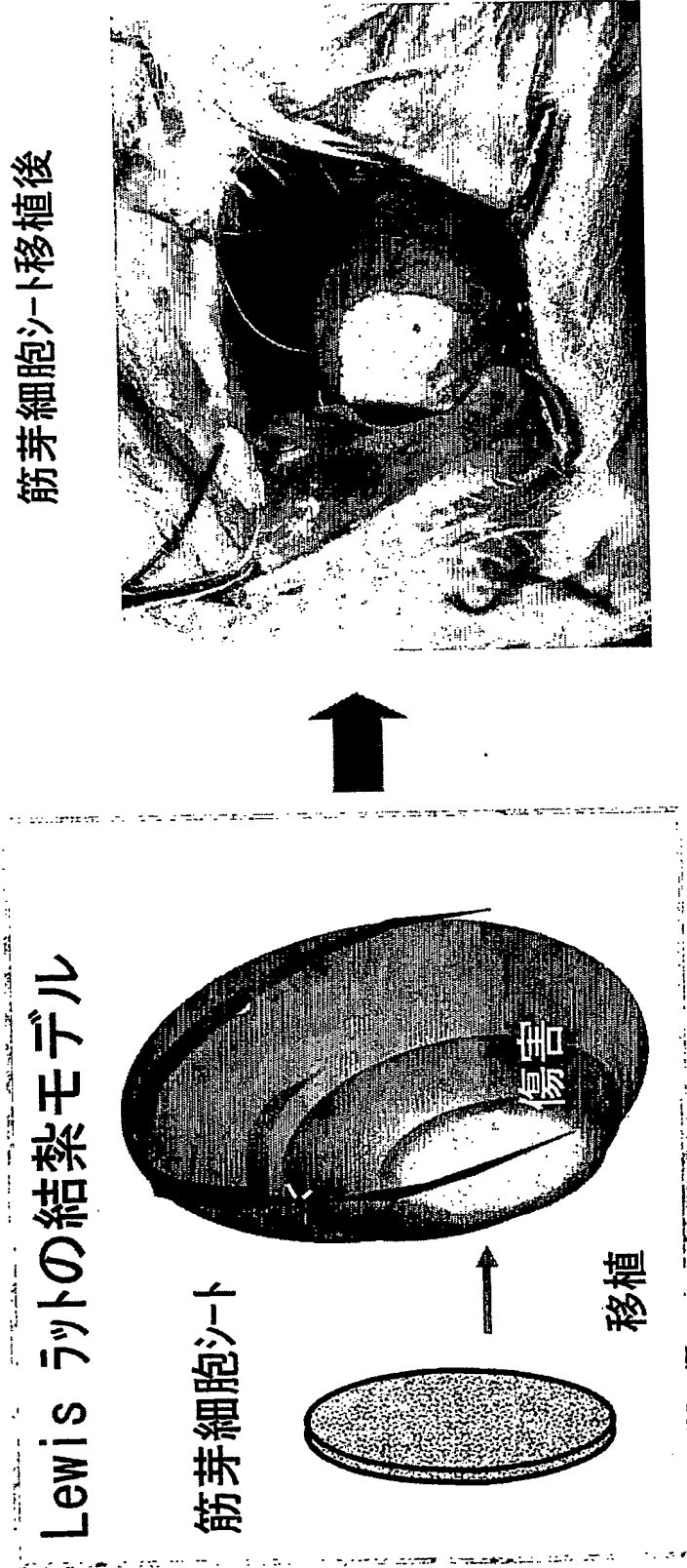
【図 15】

筋芽細胞シート: 移植後4週



【図 16】

筋芽細胞シート移植手順

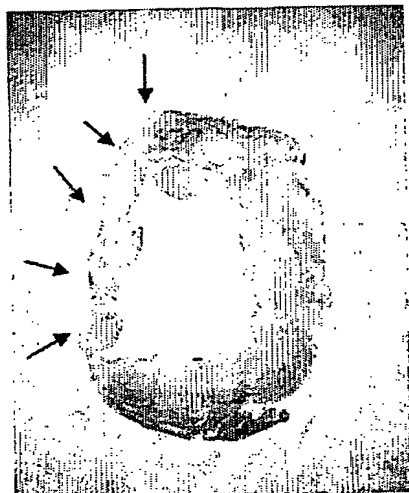


【図17】

組織学 マッソトリクローム染色

コントロール群

4週後



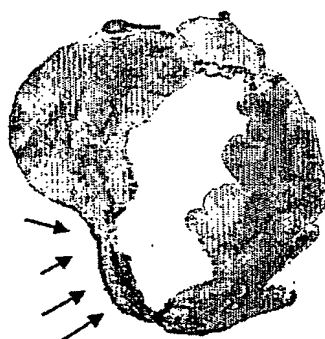
x10



x40

筋芽細胞注射

4週後



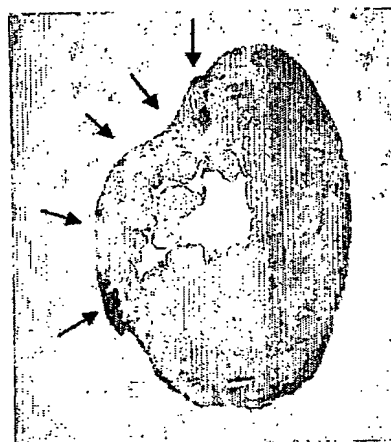
x10



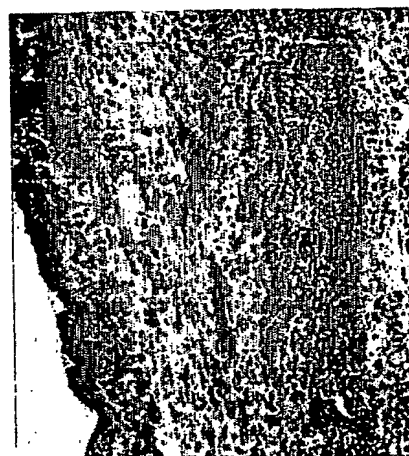
x40

筋芽細胞人工組織群

4週後

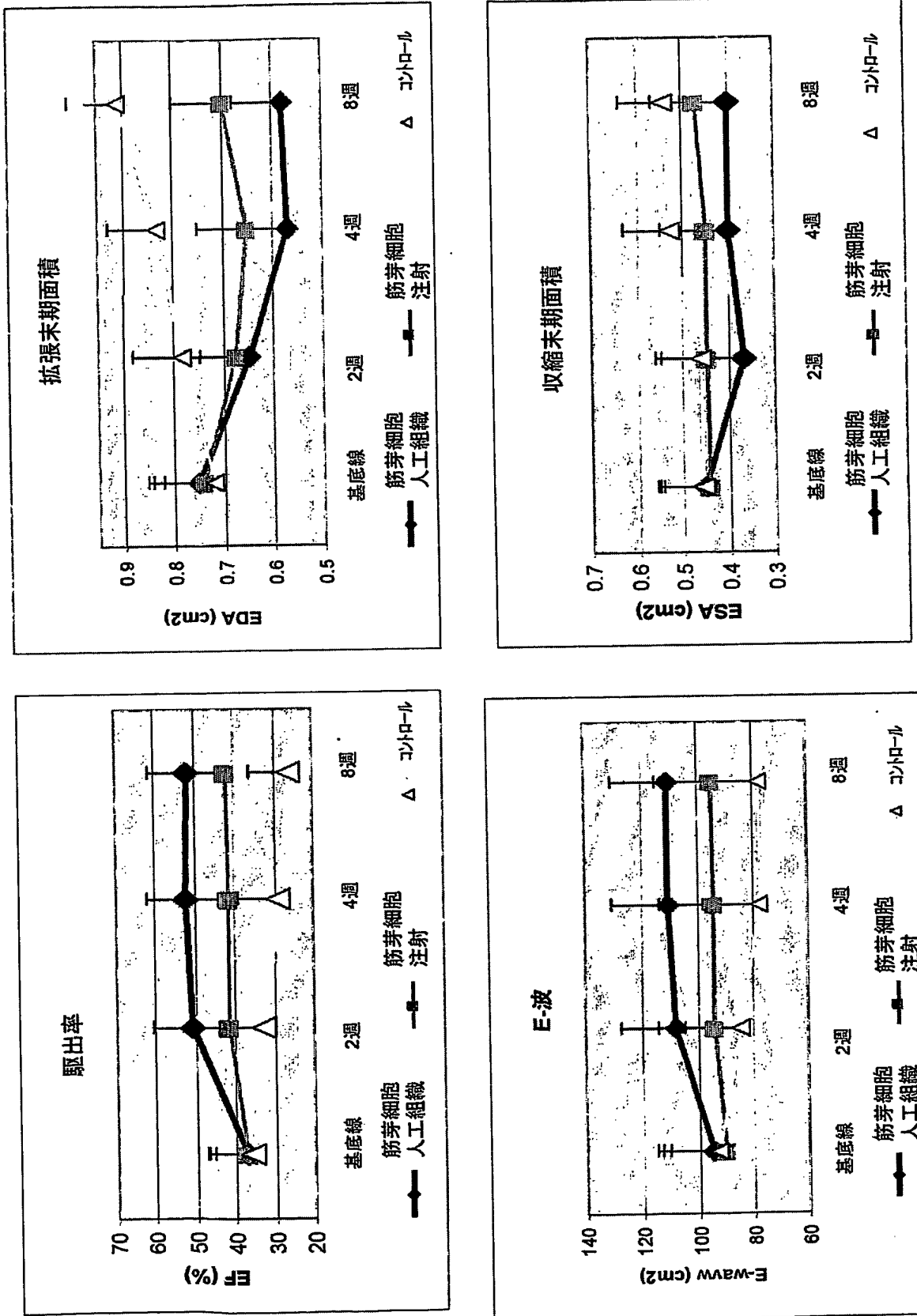


x10



x200

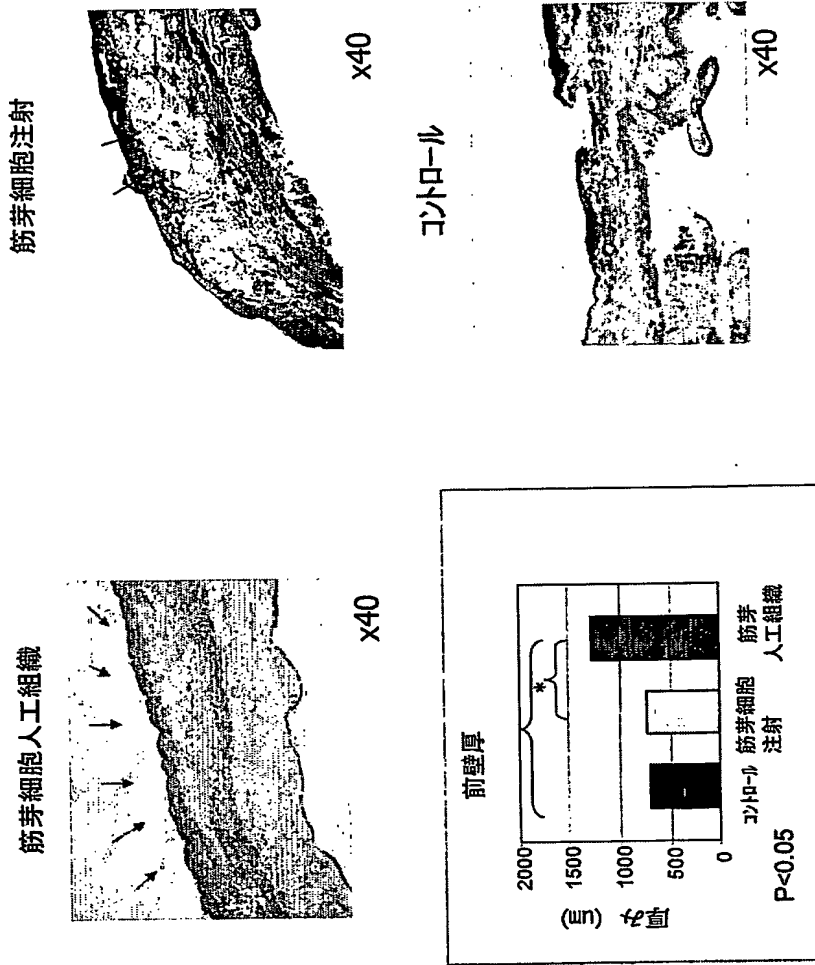
【図19】



#P<0.05 対コントロール ; *P<0.05 対注射針群

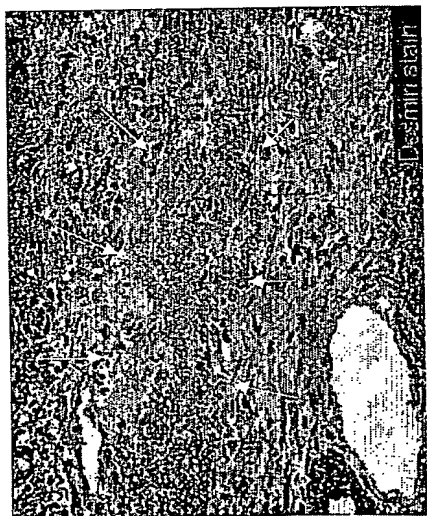
【図 20】

前壁厚比較



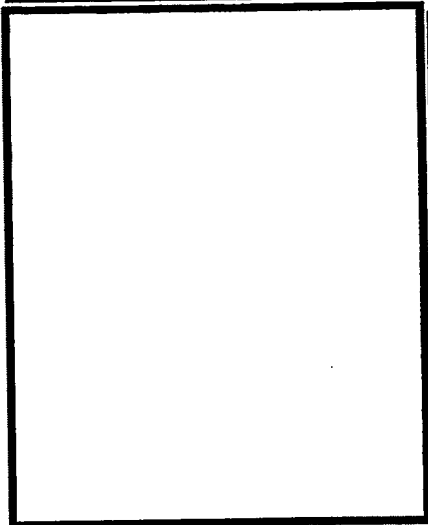
【図 21】

筋芽細胞壁: デスミン染色



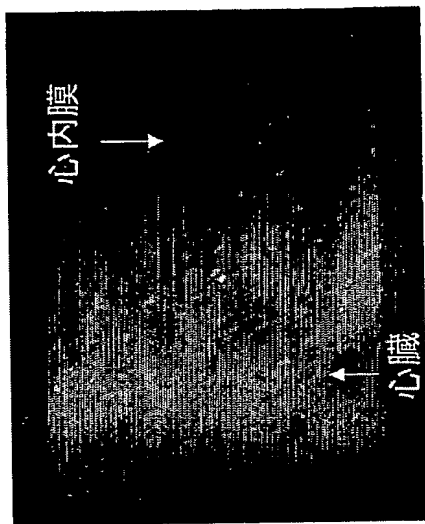
x100

コントロール群



x100

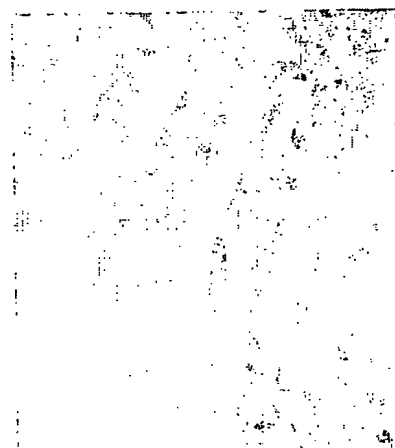
筋芽細胞人工組織群



x100

第 VIII 因子染色

コントロール



x40

筋芽細胞注射



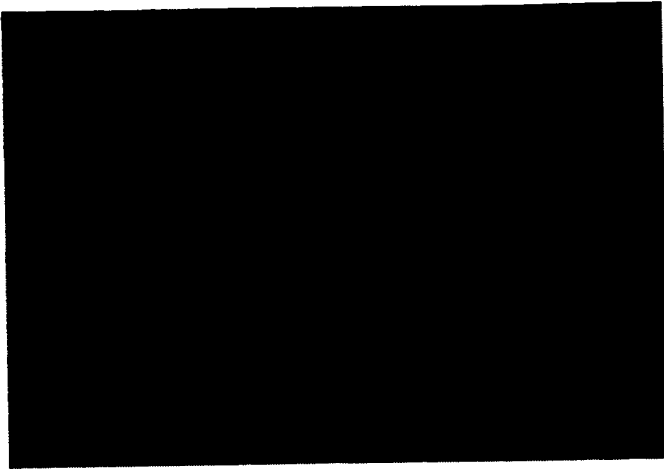
x40

筋芽細胞人工組織

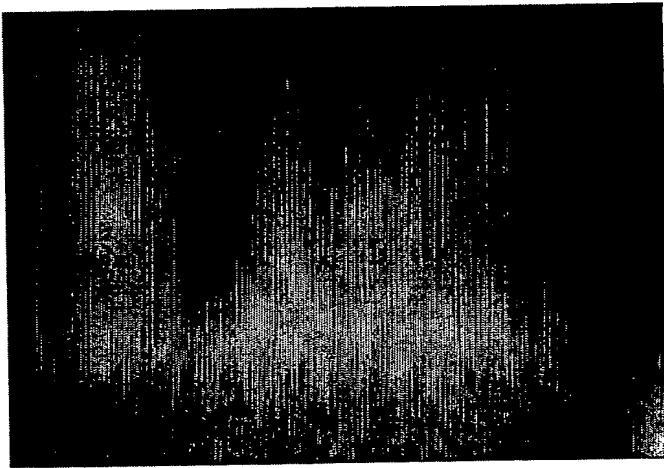


x40

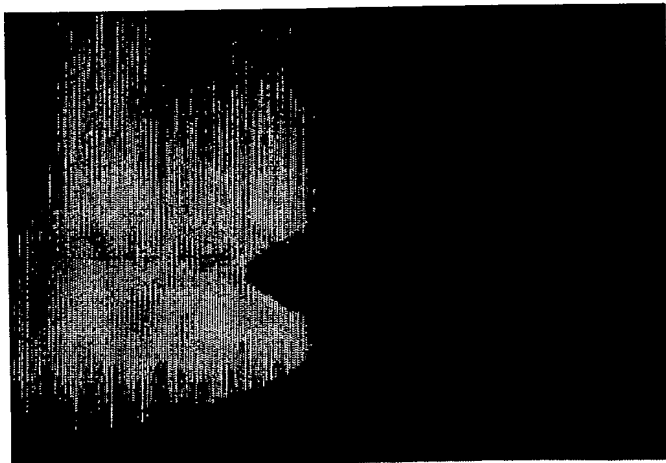
【図 22 A】



【図 22 B】



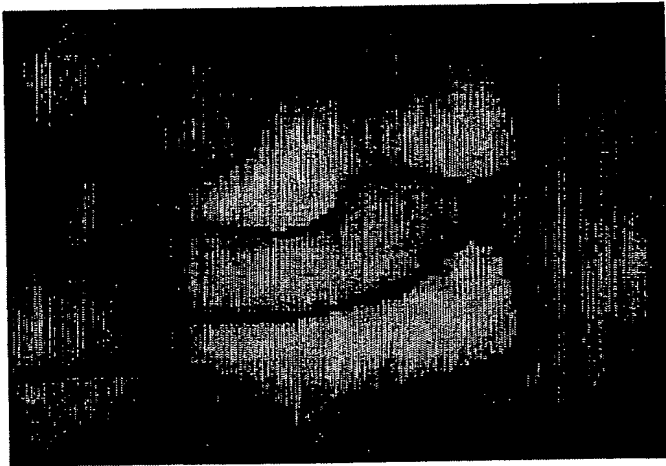
【図 22 C】



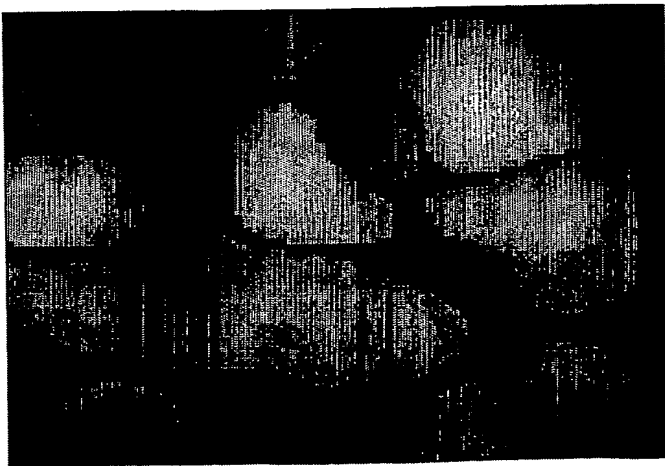
【図 22D】



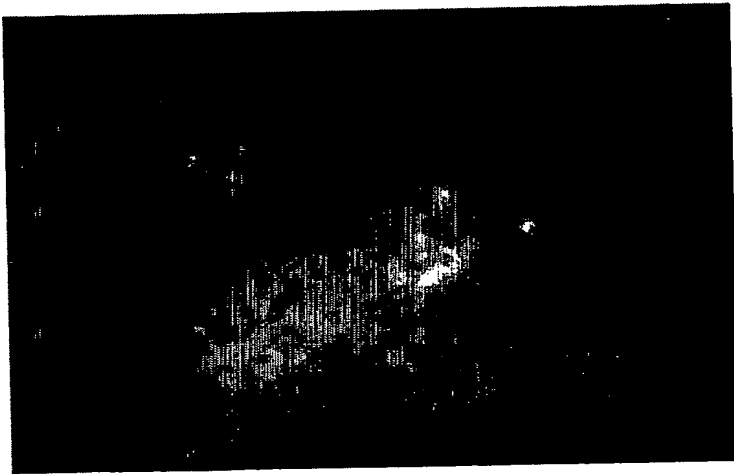
【図 22E】



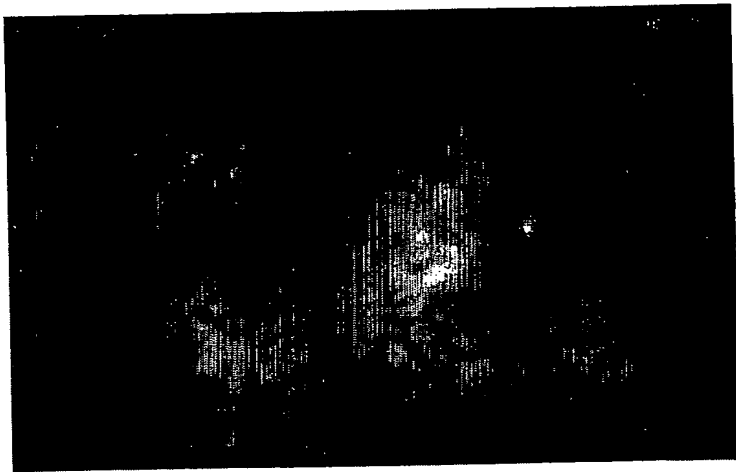
【図 22F】



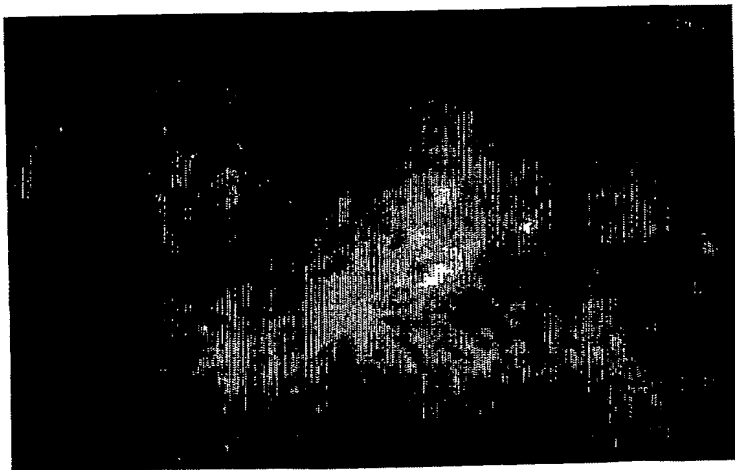
【図 23 A】



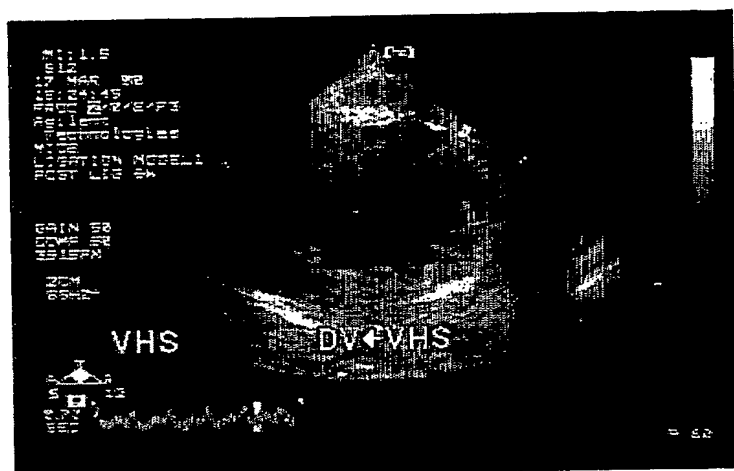
【図 23 B】



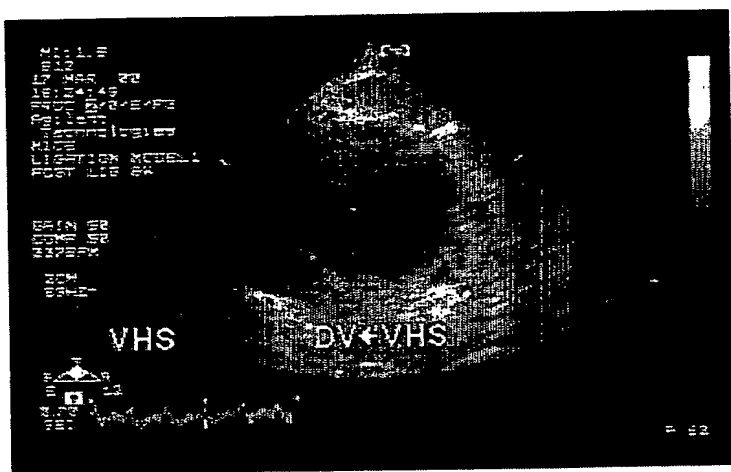
【図 23 C】



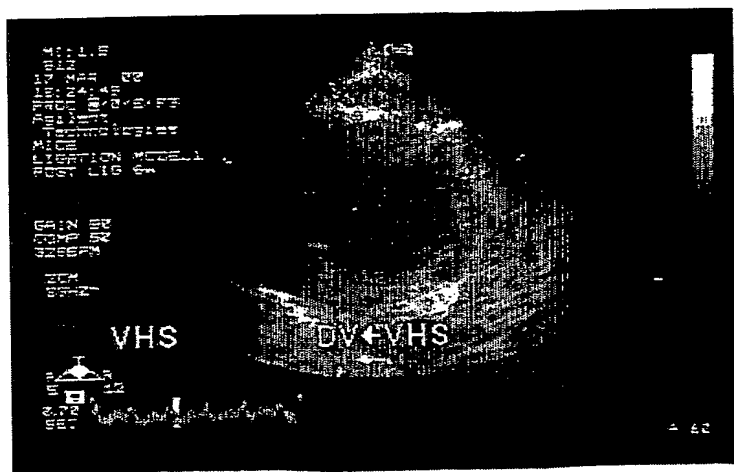
【図 24 A】



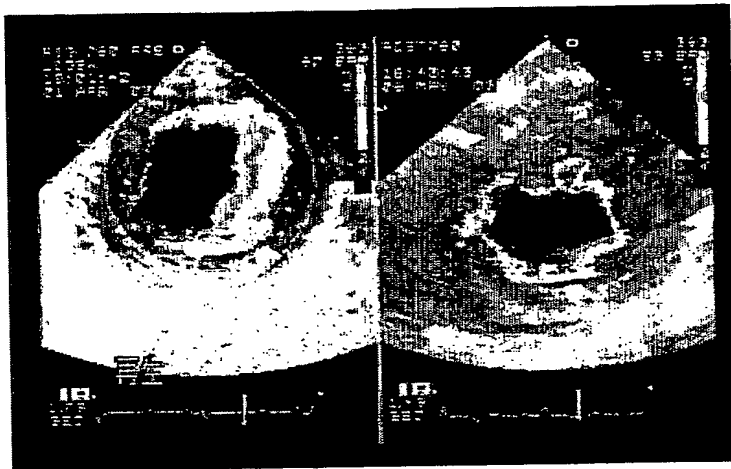
【図 24 B】



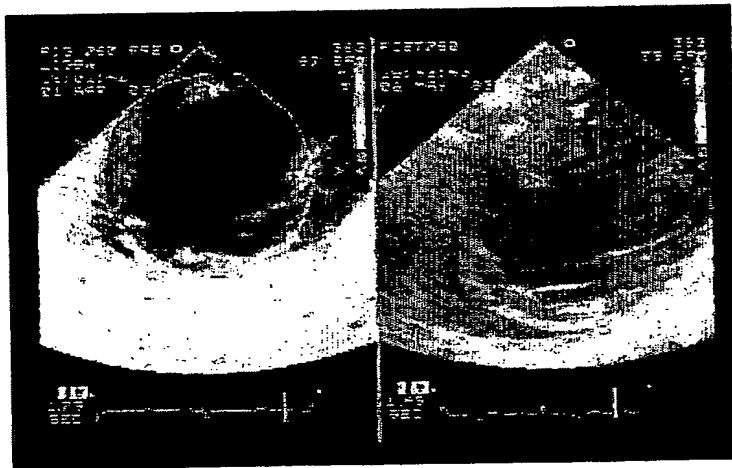
【図 24 C】



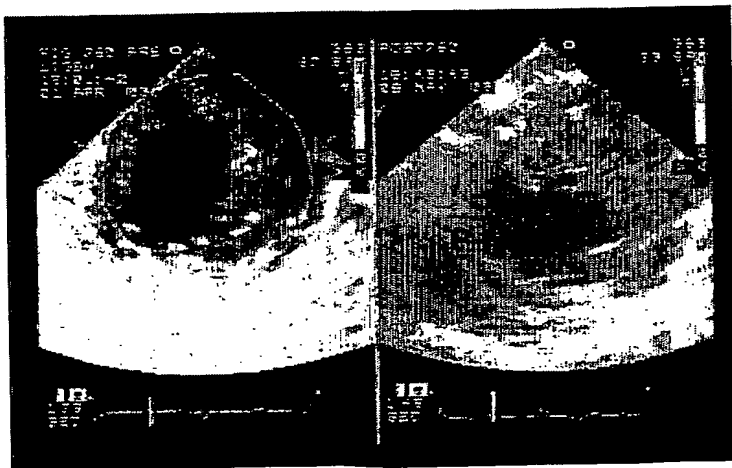
【図 25 A】



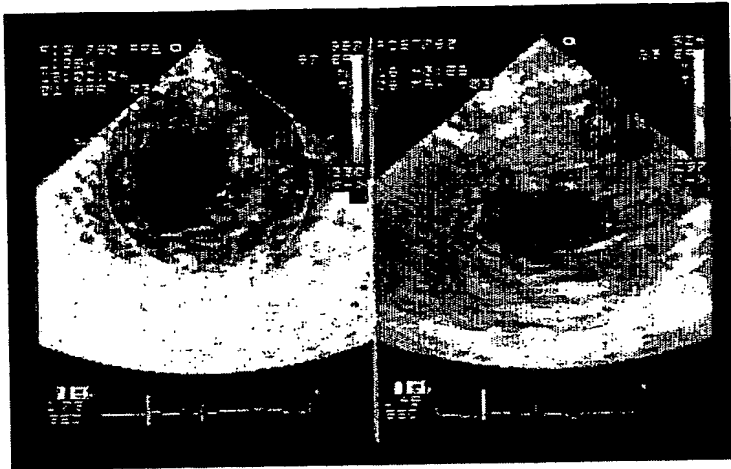
【図 25 B】



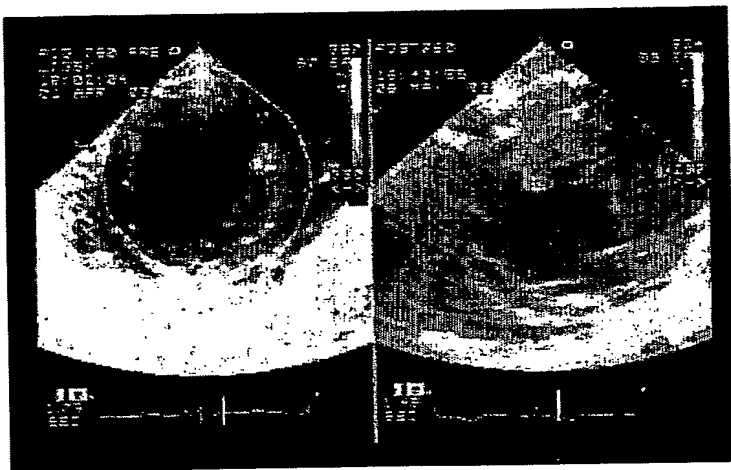
【図 25 C】



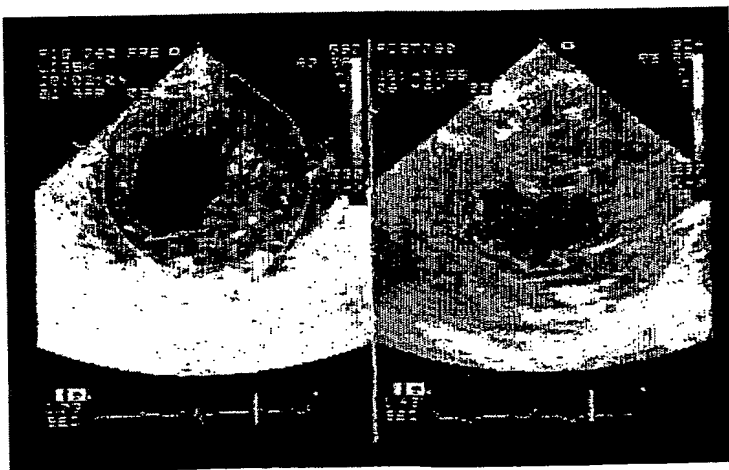
【図 26】



【図 27】



【図 28】



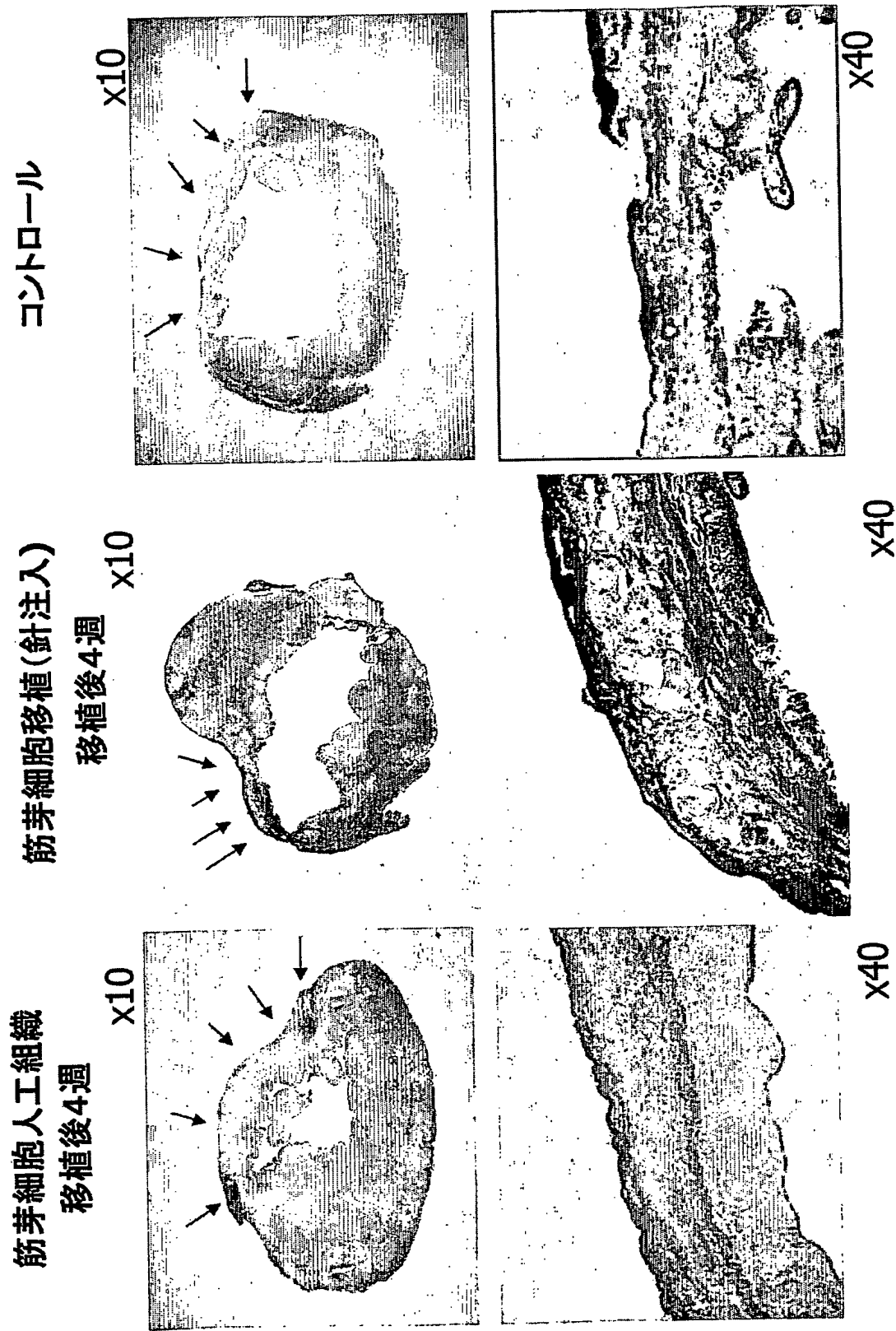
VHS

EX-VHS

VHS DV-VHS

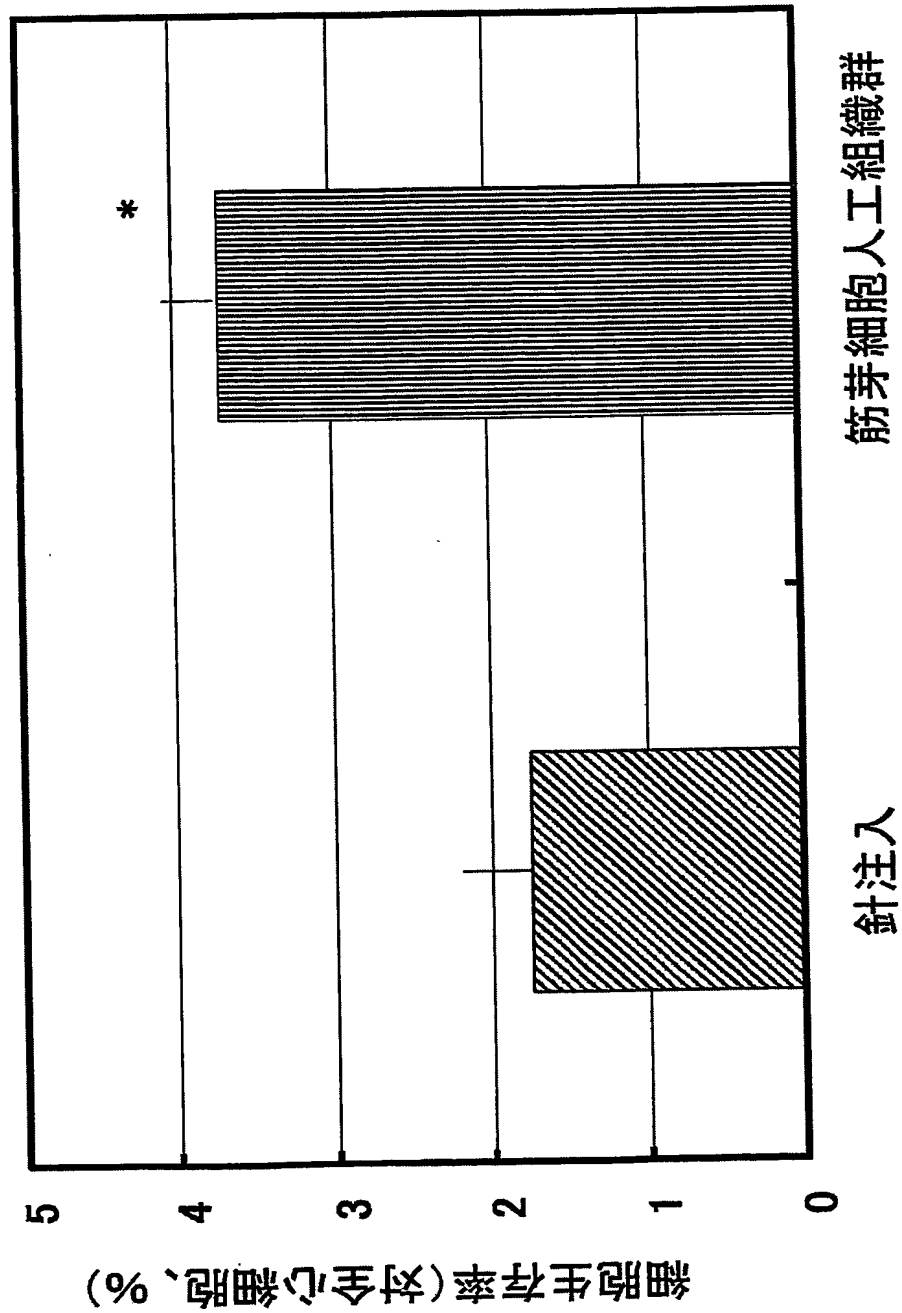
【図 30】

組織(マッソン-トリクローム染色)



【図 31】

移植細胞の生存率



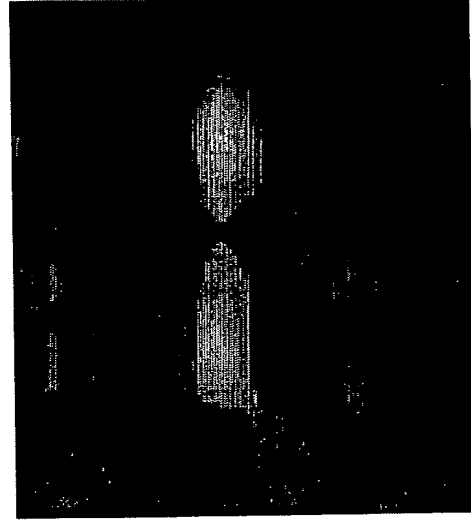
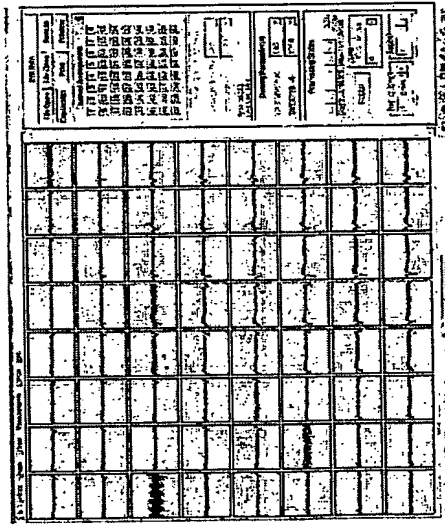
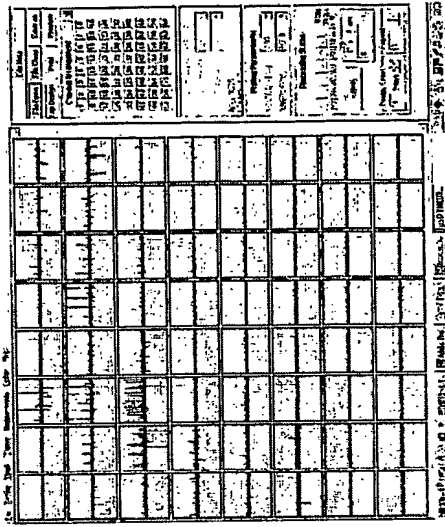
【図 32】

筋芽細胞人工組織の電気的特性

MEDシステム

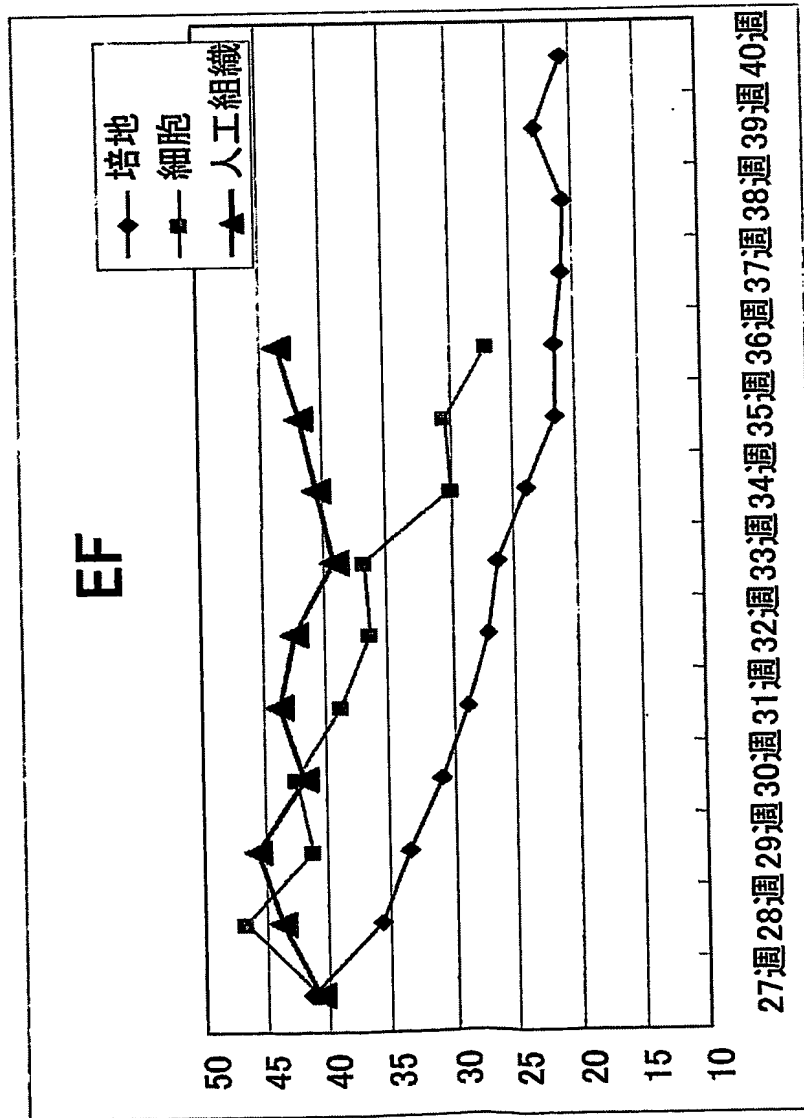
心筋細胞人工組織

筋芽細胞人工組織



【図33】

拡張型心筋症ハムスターに対する 筋芽細胞人工組織移植



HE染色

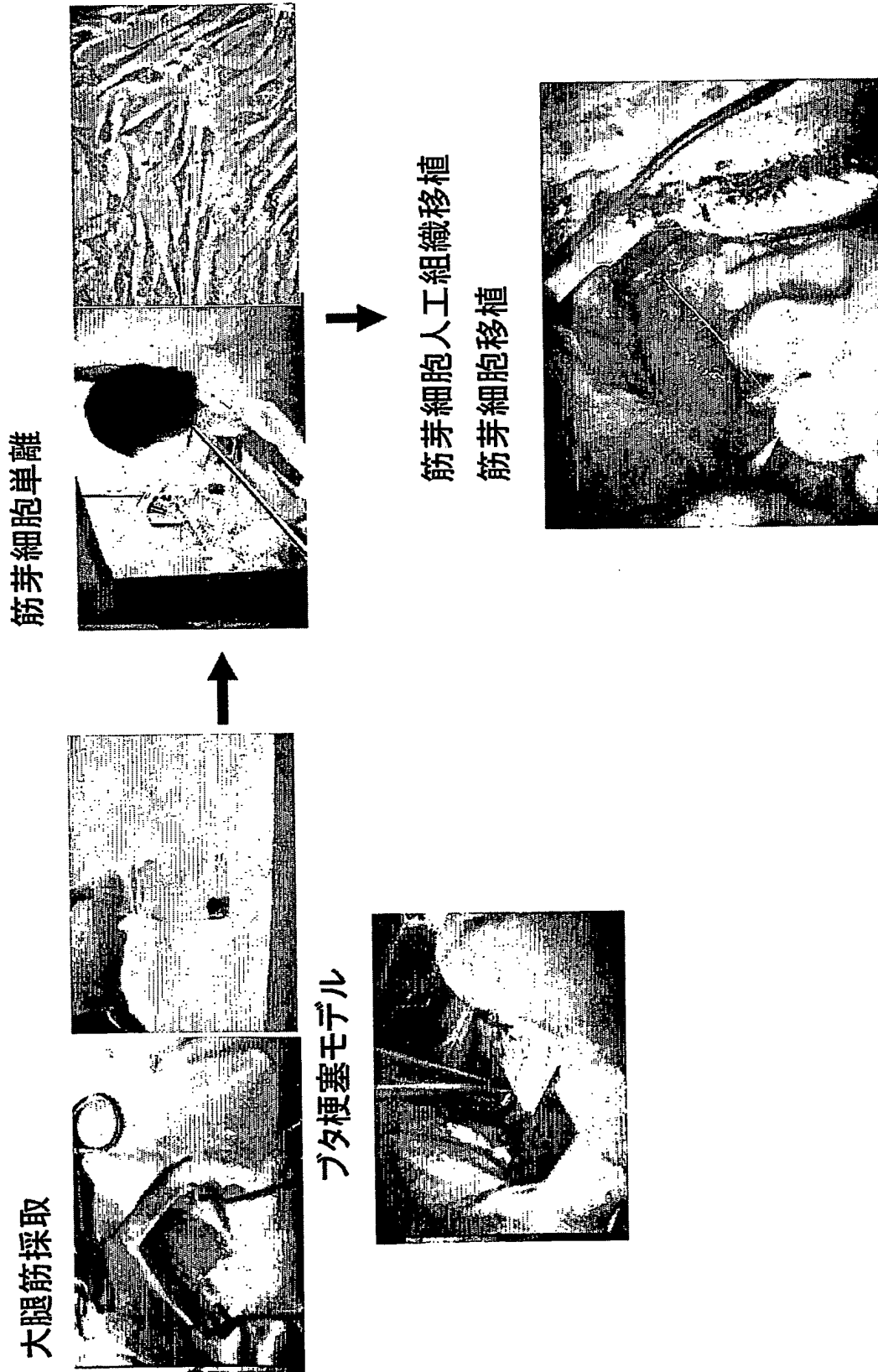


マッソン-トリクローム染色



【図 34】

ブタ梗塞モデルに対する筋芽細胞人工組織移植

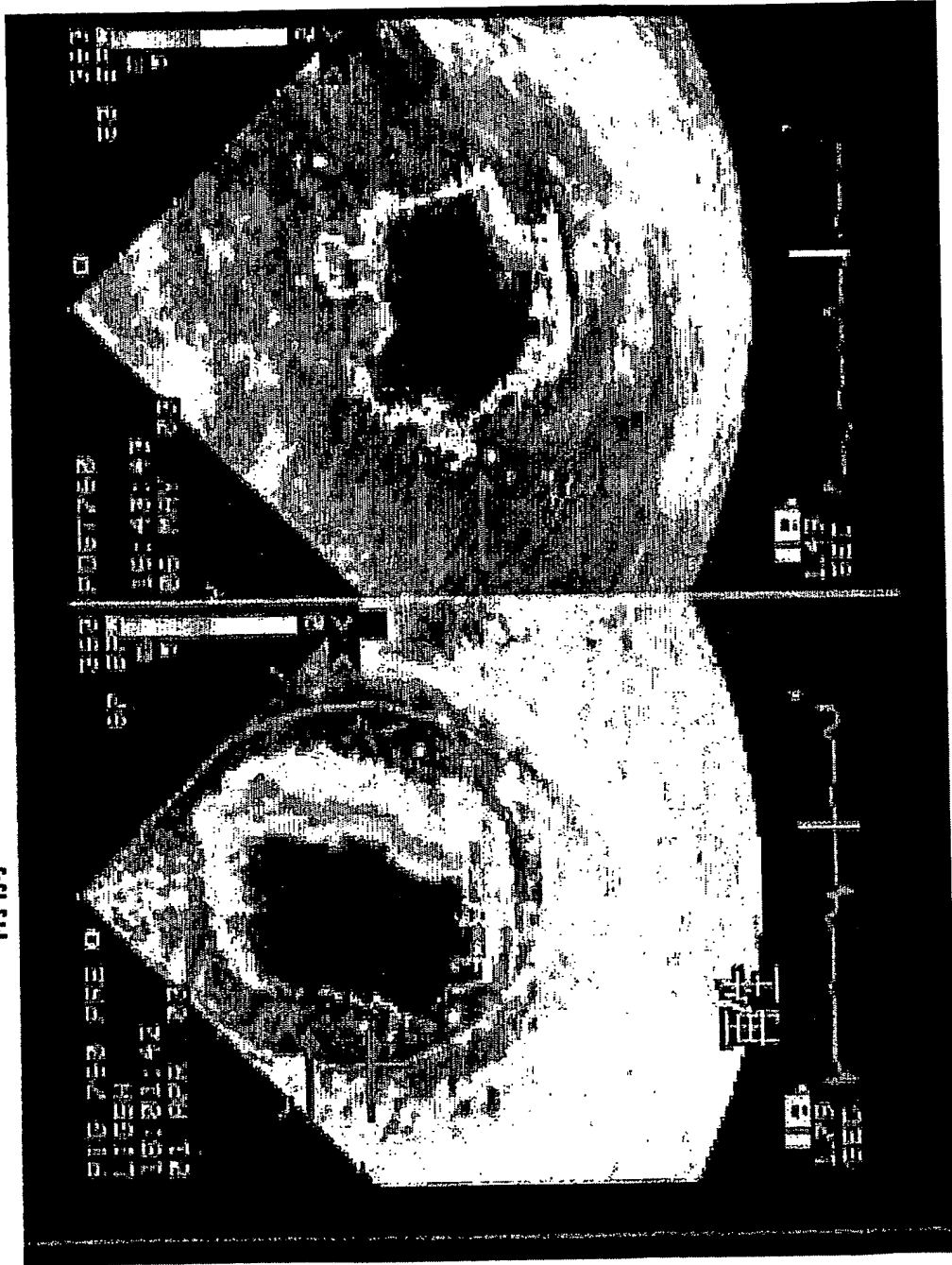


【図 35】

CKI法によるブタ梗塞心機能評価(収縮能)

術後

術前



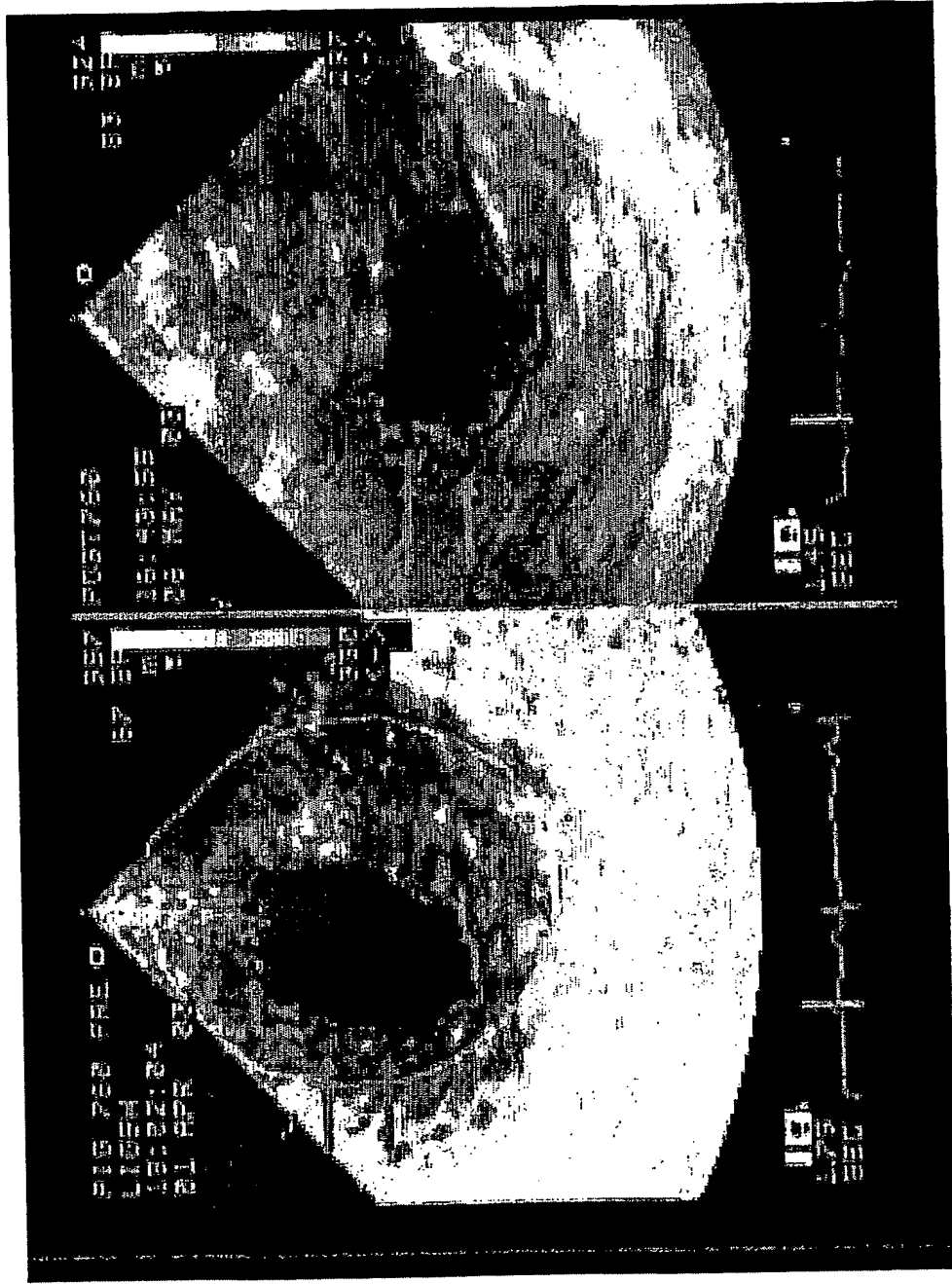
移植部位

【図 36】

CKI法によるブタ梗塞心機能評価(拡張能)

術後

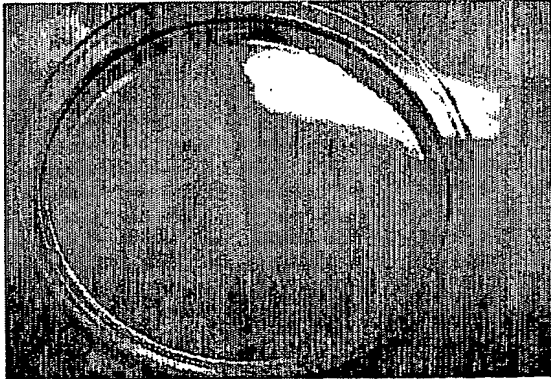
術前



↑
移植部位

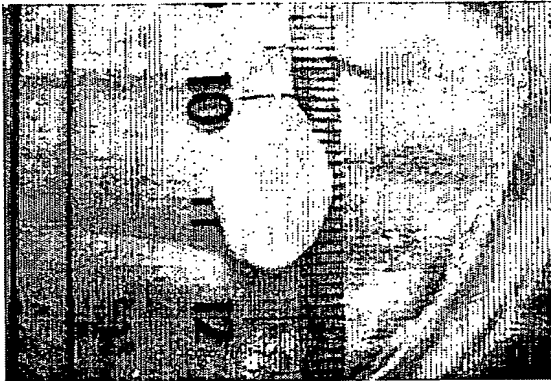
【図 37】

アスコルビン酸未投与

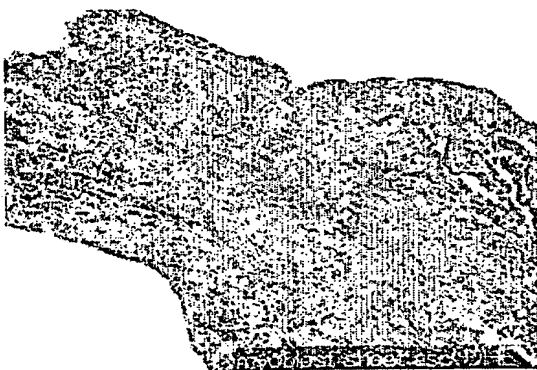


【図 38】

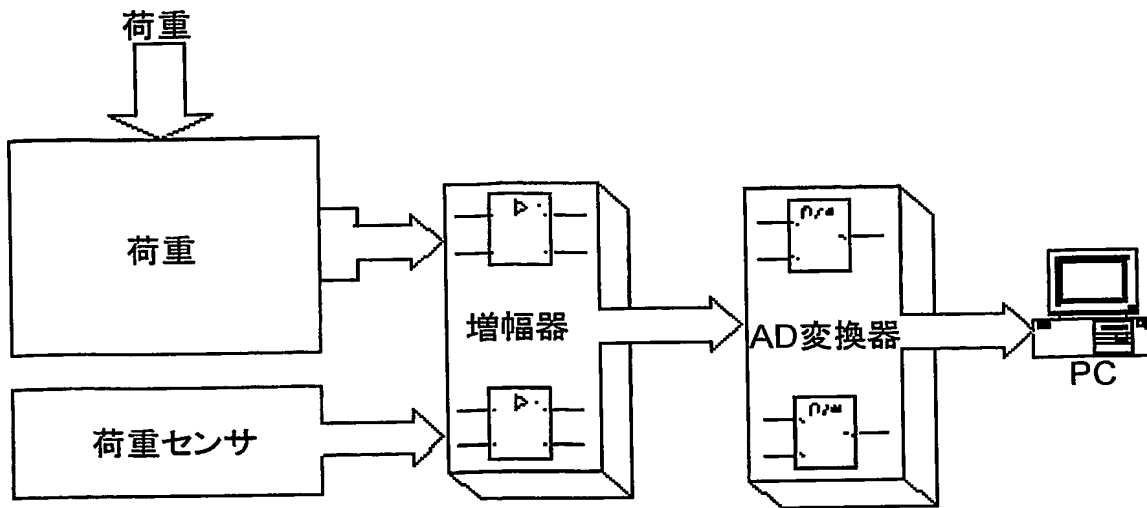
アスコルビン酸投与



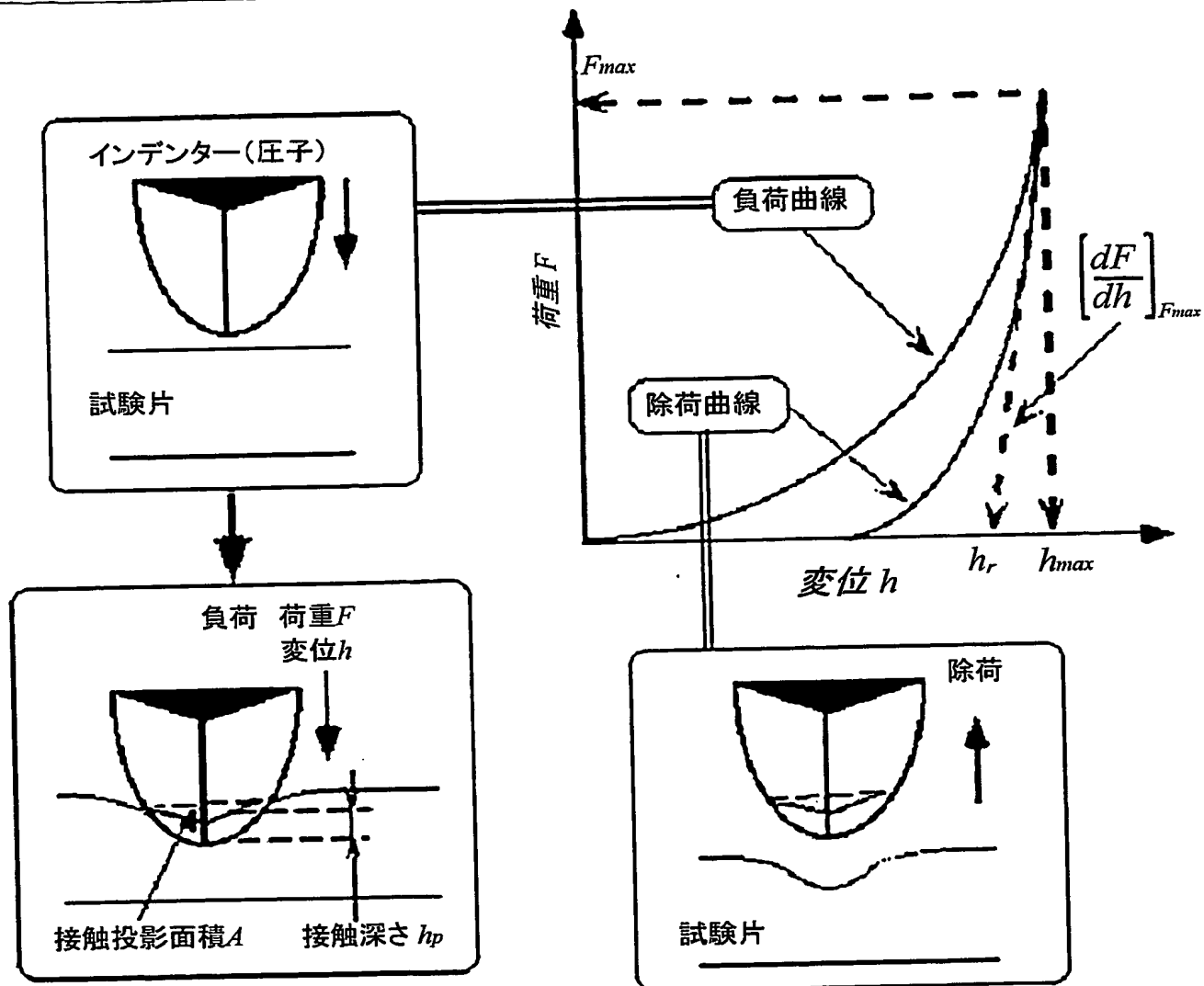
【図 39】



【図 40】



【図 4 1】



$$\text{硬さ } H = \frac{F}{A} = \frac{F}{k_1 h_p^2}$$

$$\text{ヤング率 } E = \left[\frac{dF}{dh} \right]_{F_{max}} \frac{1 - \nu^2}{2 \cdot k_2 \cdot h_{pmax}}$$

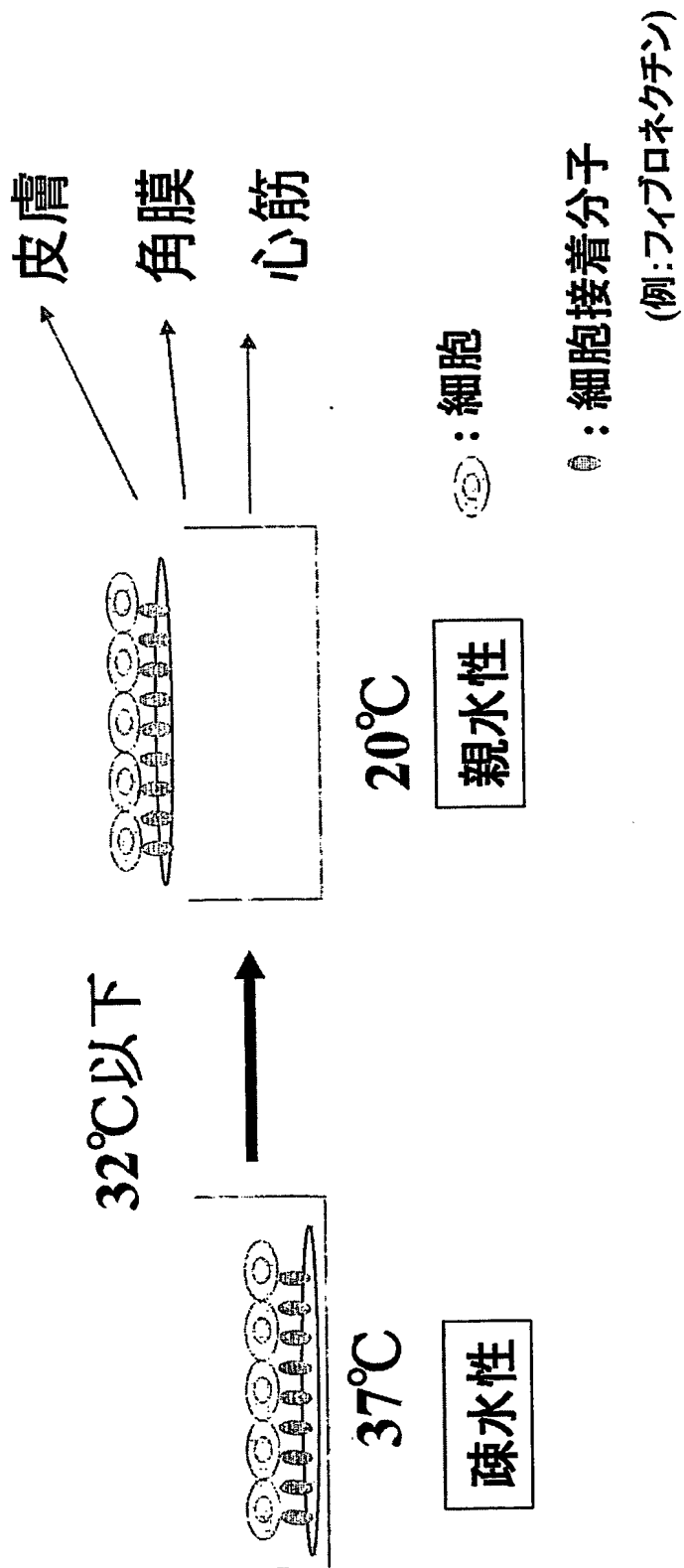
$$\text{接触深さ } h_p = h_r + 0.25(h_{max} - h_r)$$

F : 荷重
 A : 接触投影面積
 h_p : 接触深さ
 k_1, k_2 : 形状係数
 F_{max} : 最大荷重
 h_{max} : 最大変位
 h_r : 接線が荷重 0 で交わる点
 dF/dh : 除荷曲線の接線の傾き
 ν : ポアソン比

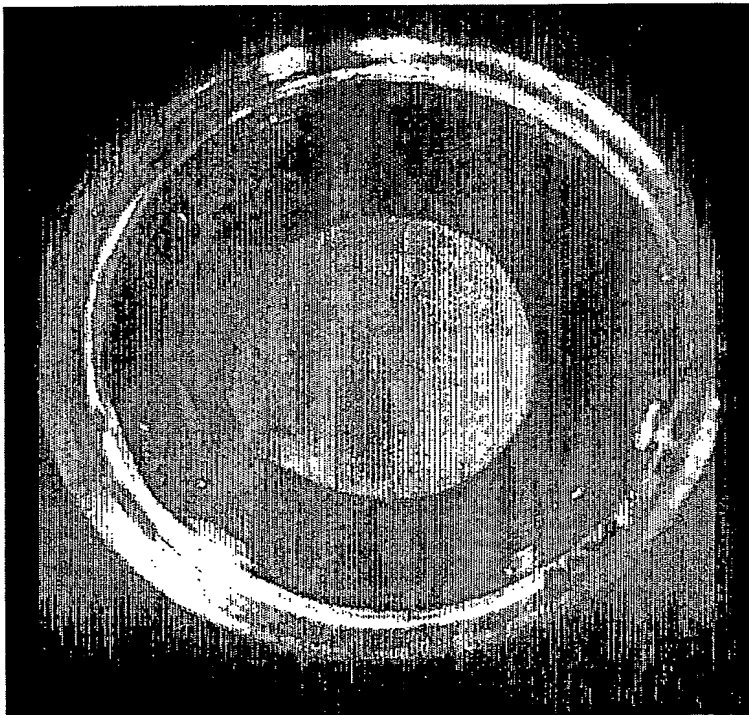
【図 42】



【図43】



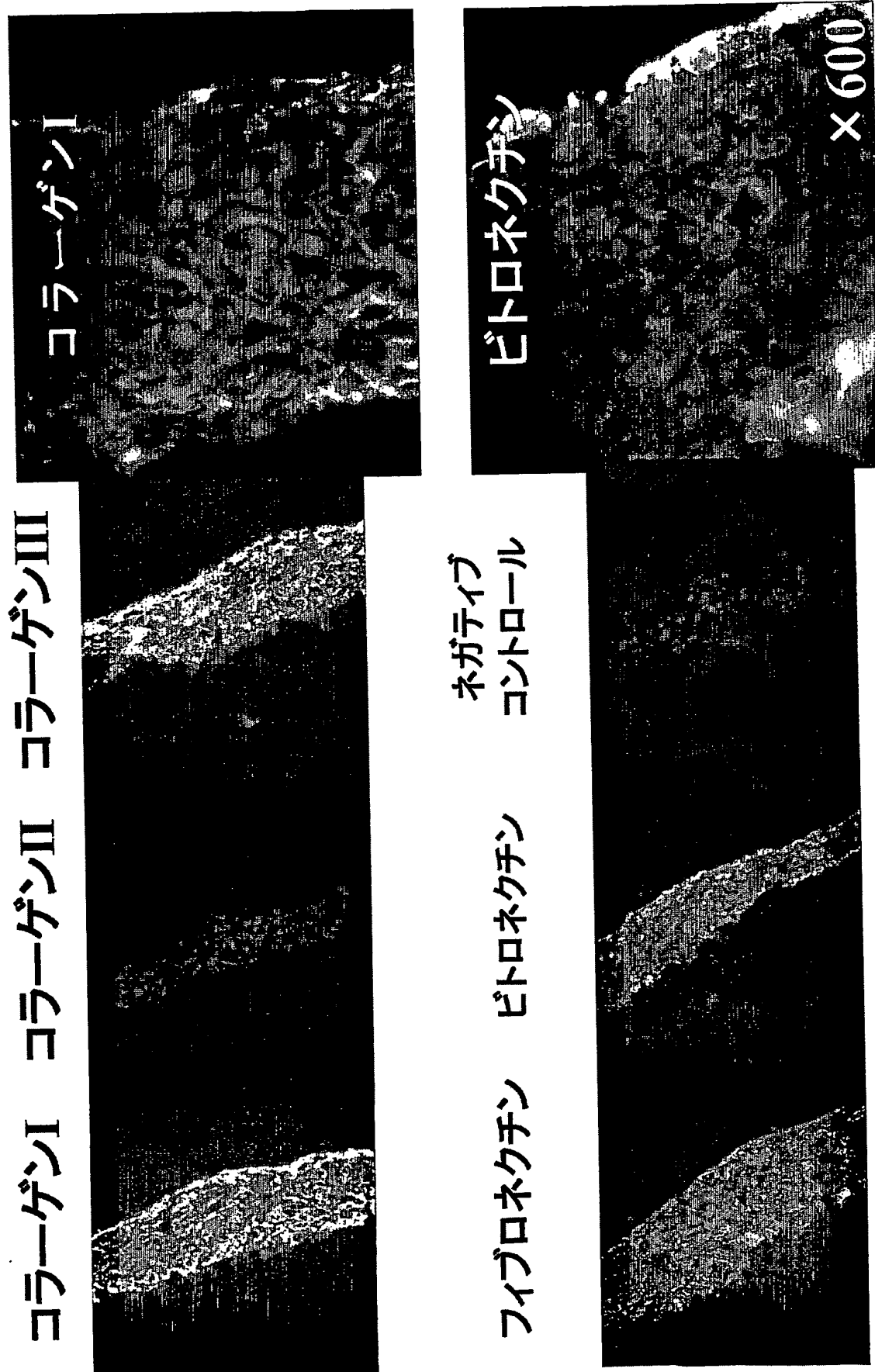
【図 44】



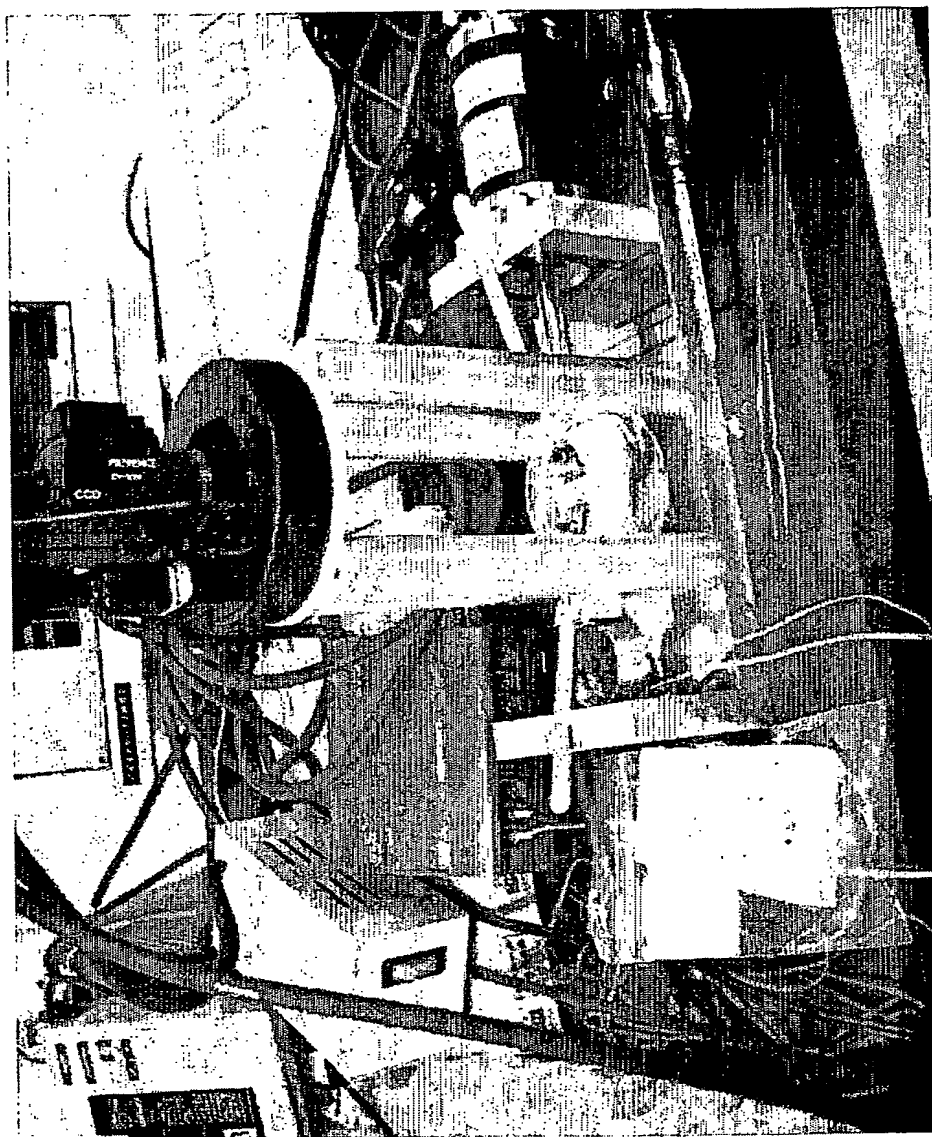
$\times 200$

(1×10^7)

【図 4 5】

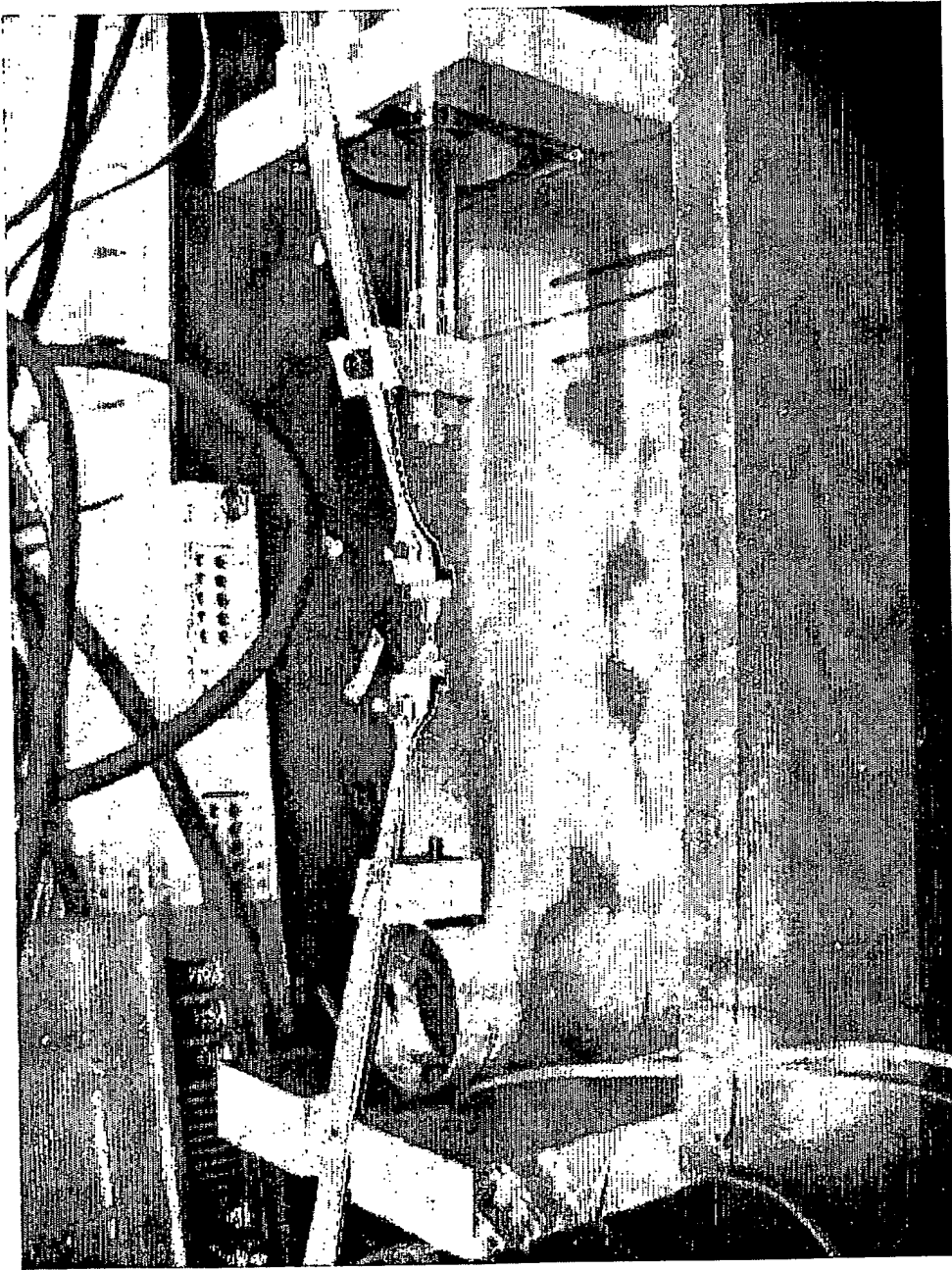


【図 46】

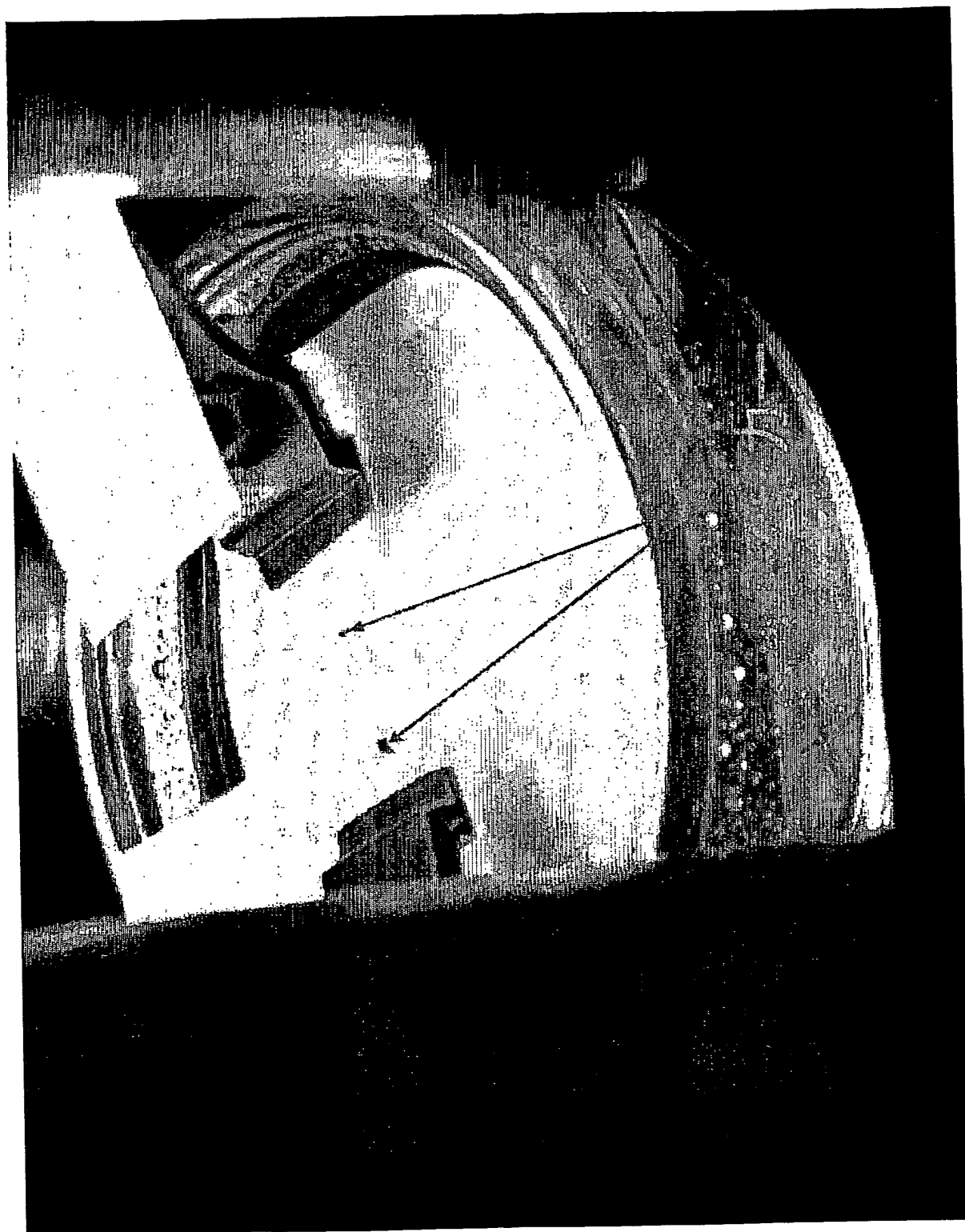


実験風景(試験片:カラーゲンシート)

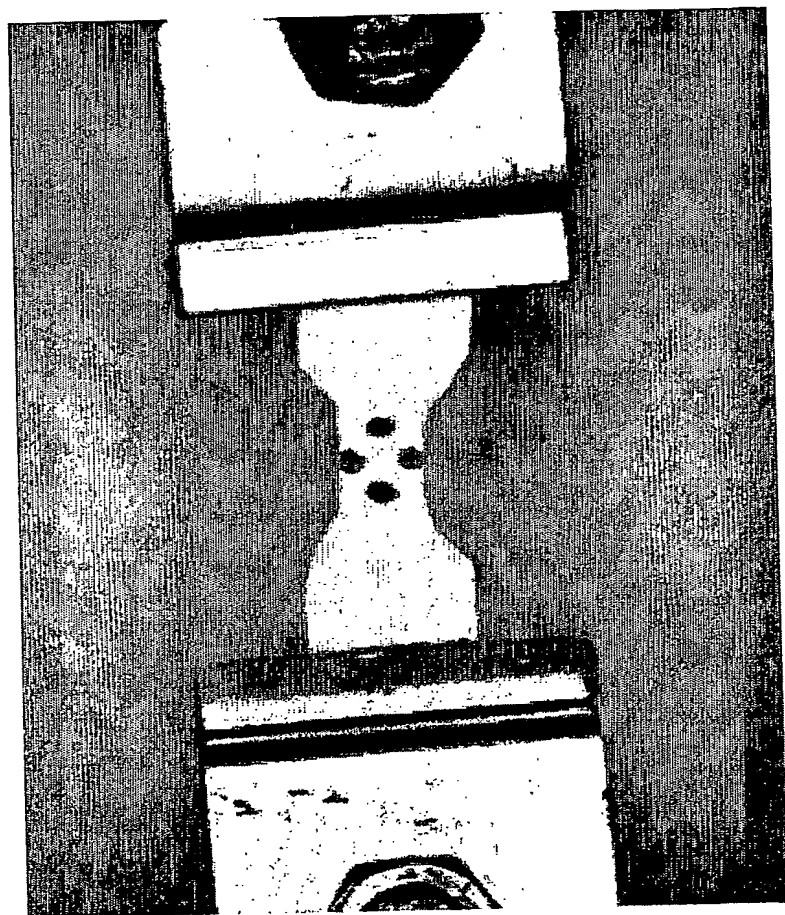
【図 47】



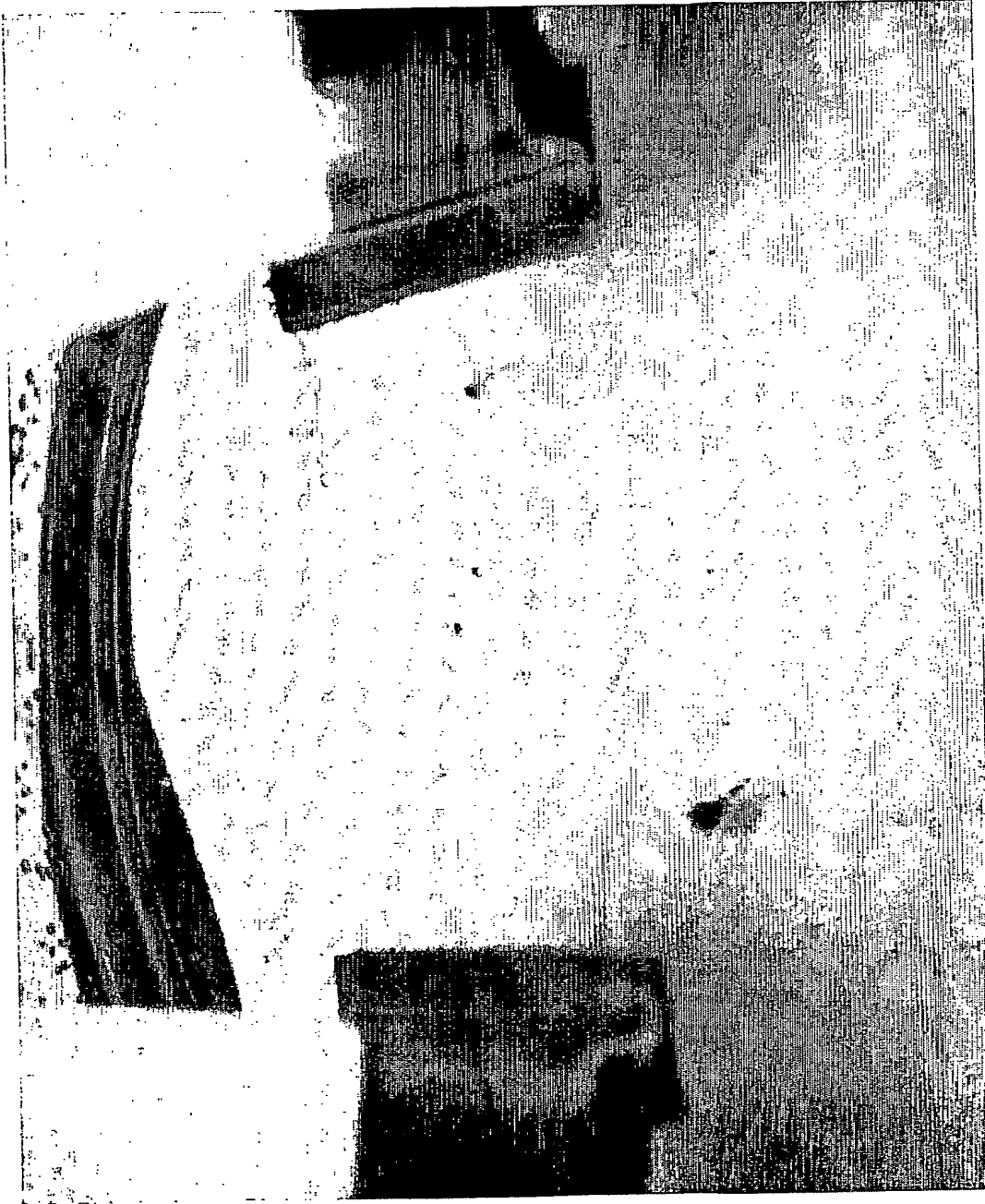
【図 48】



【図 49】

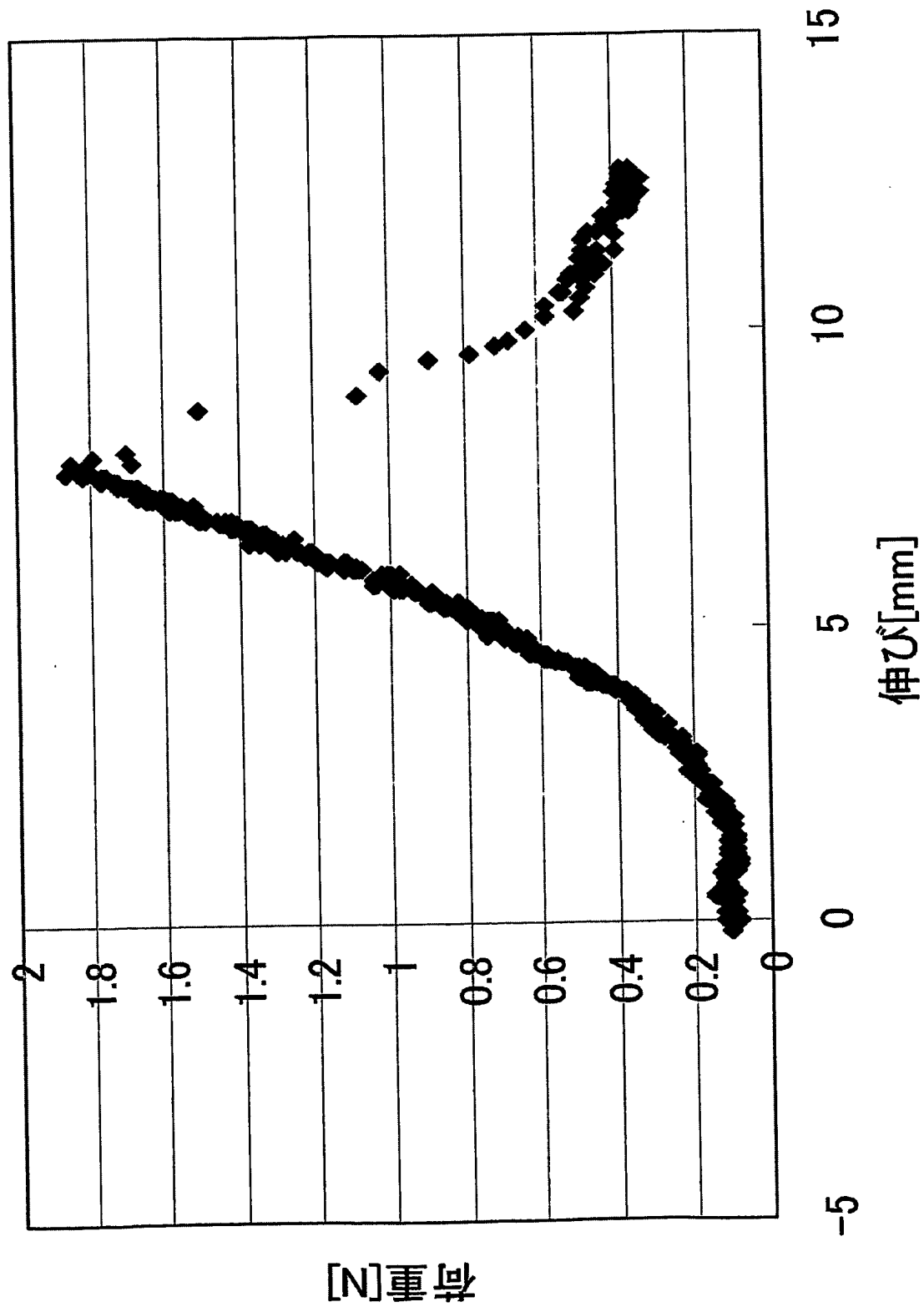


【図 50】

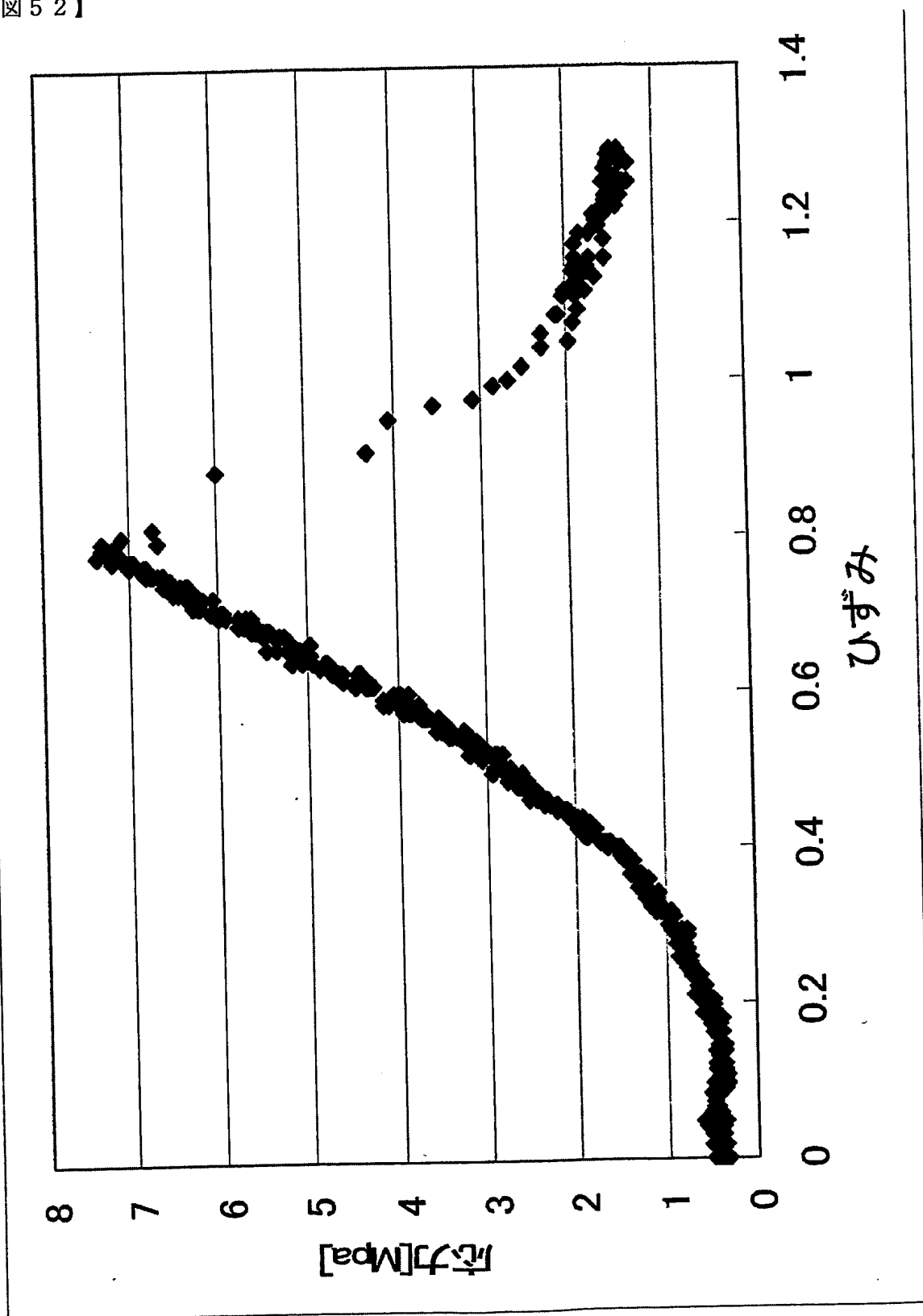


コラーゲンシート破断(実験後)

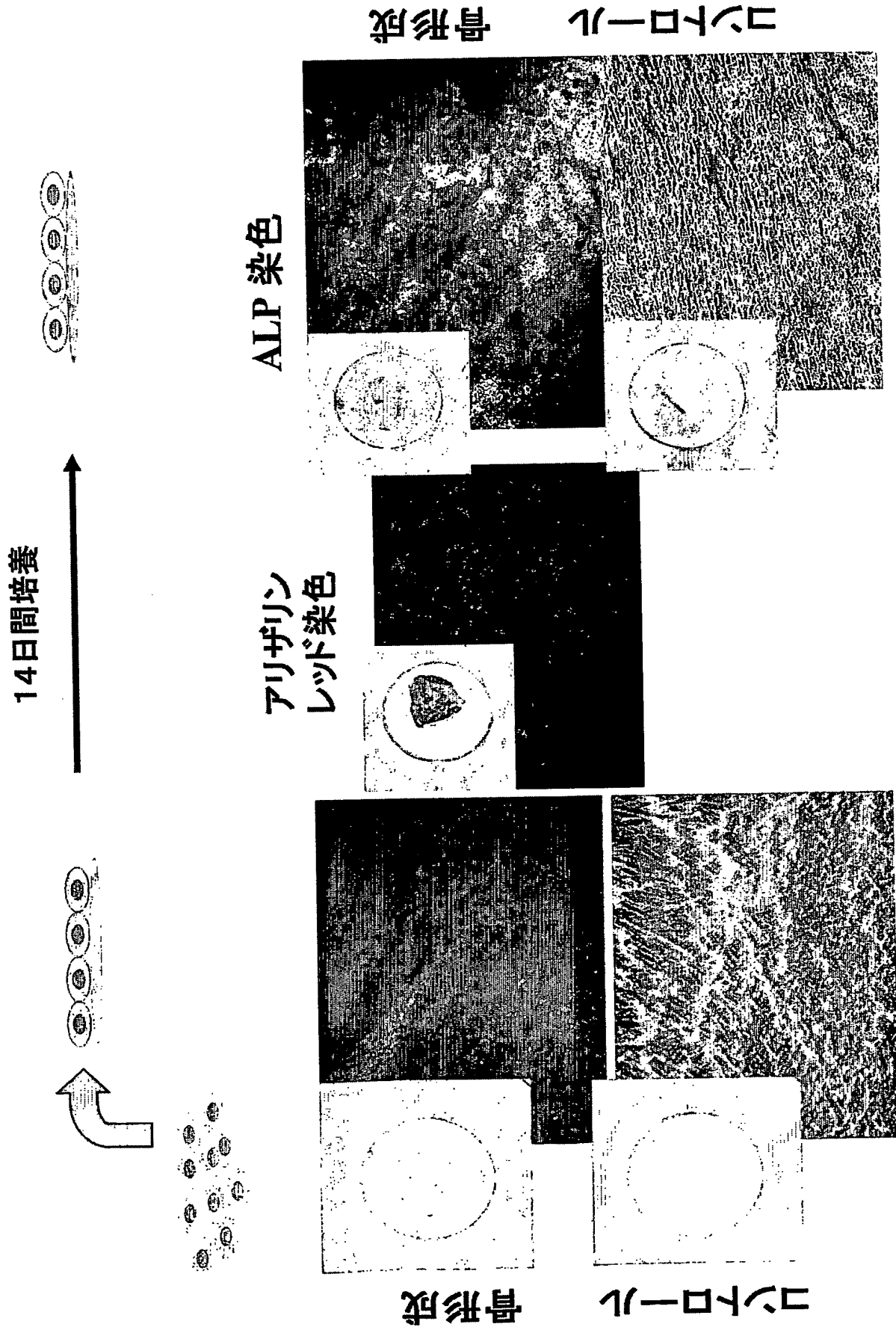
【図 51】



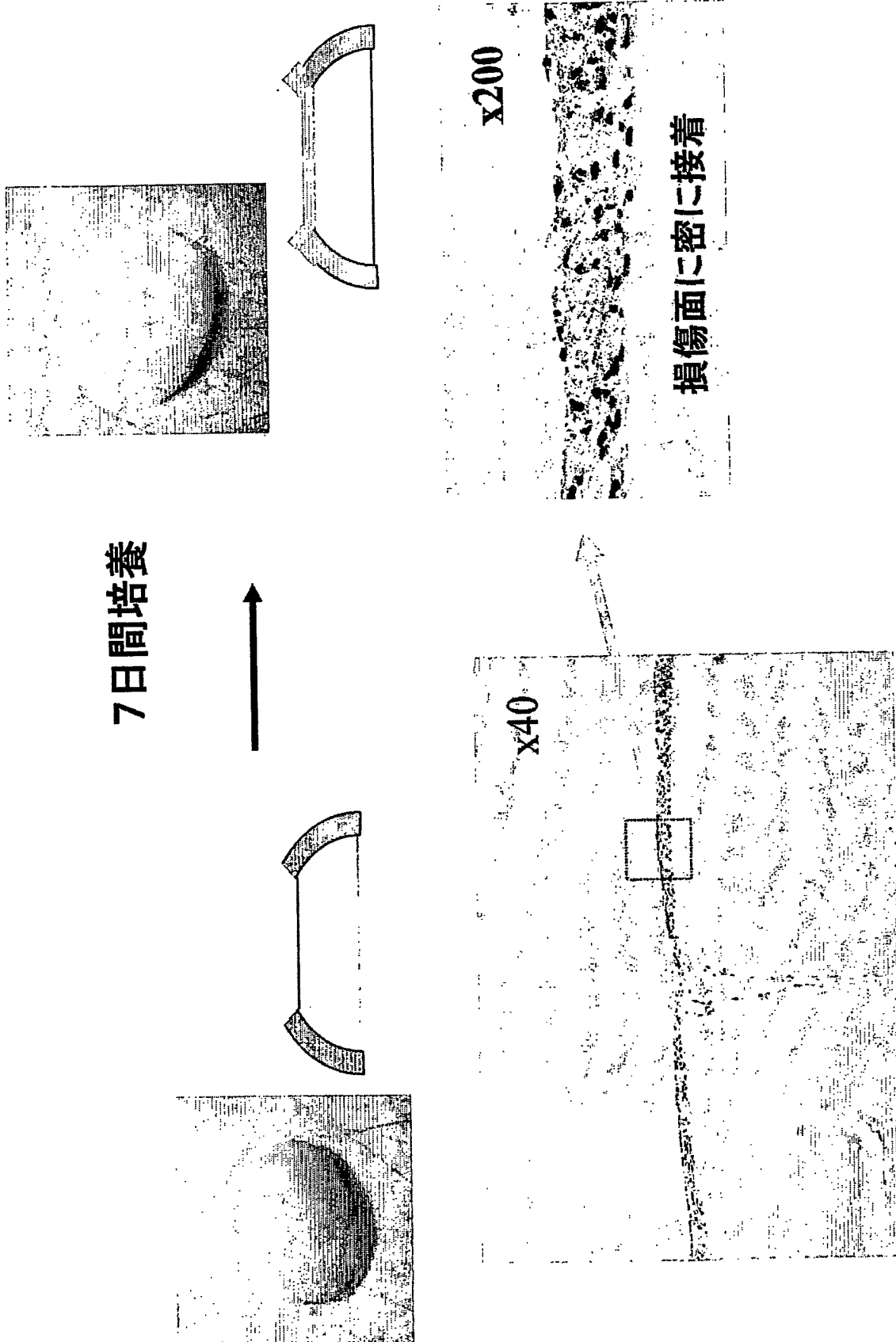
【図 52】



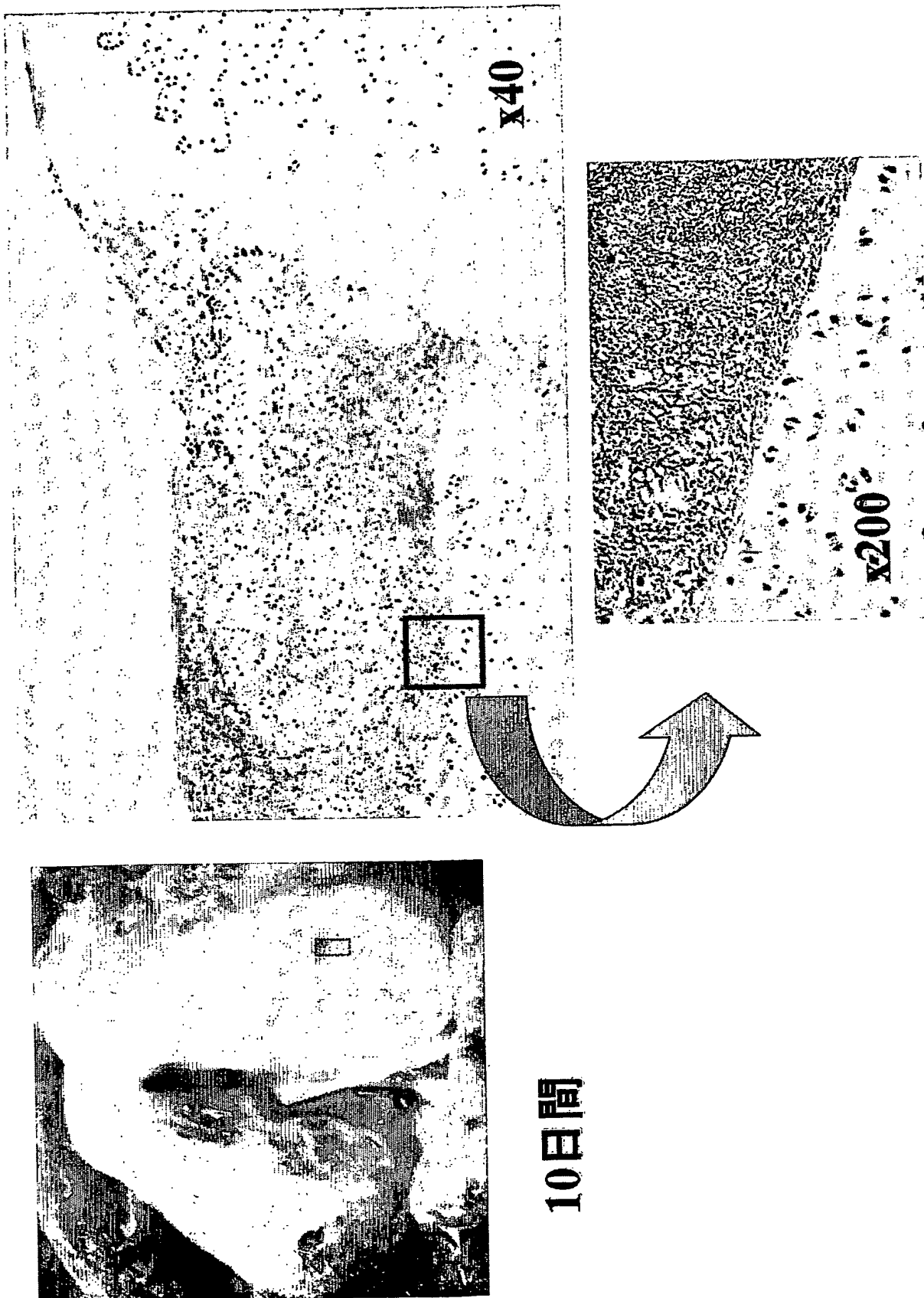
【図 53】



【図 54】



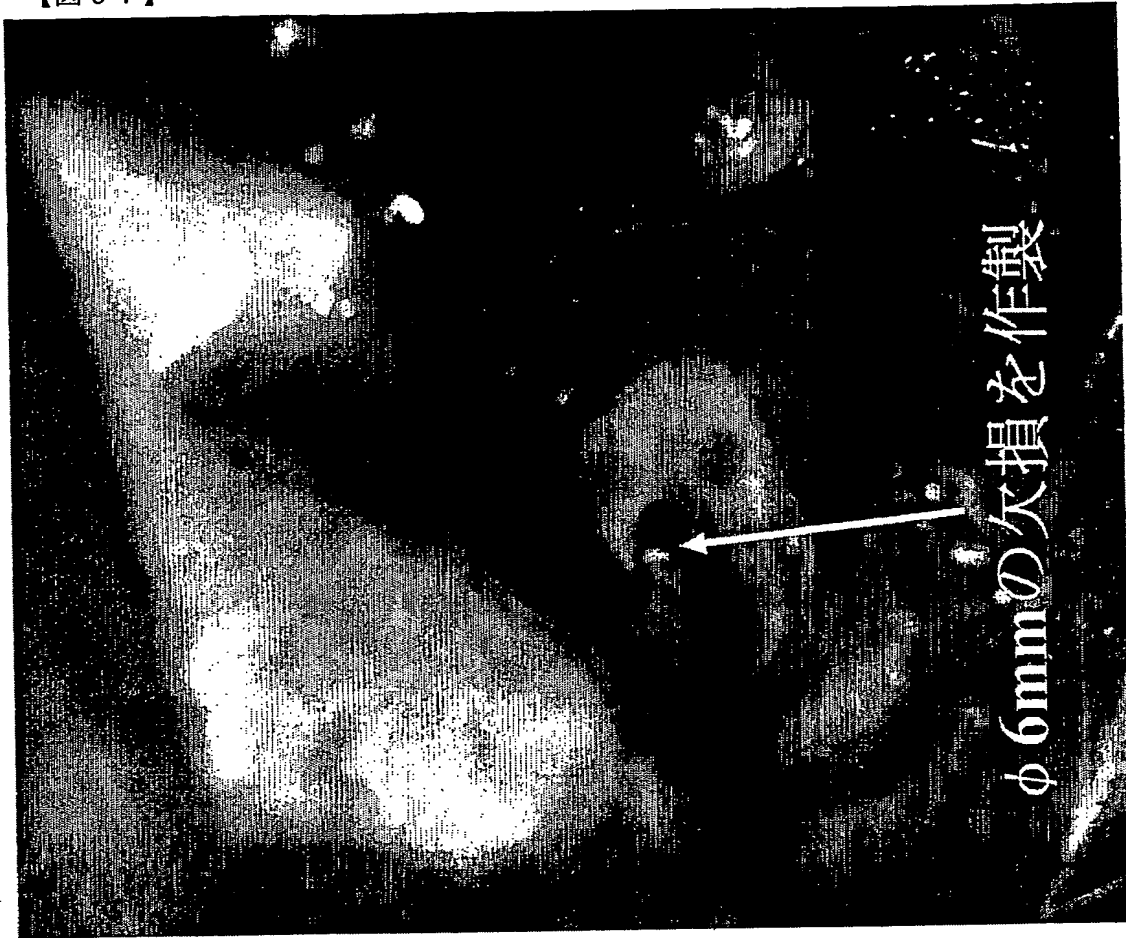
【図 55】



【図 56】



【図 57】



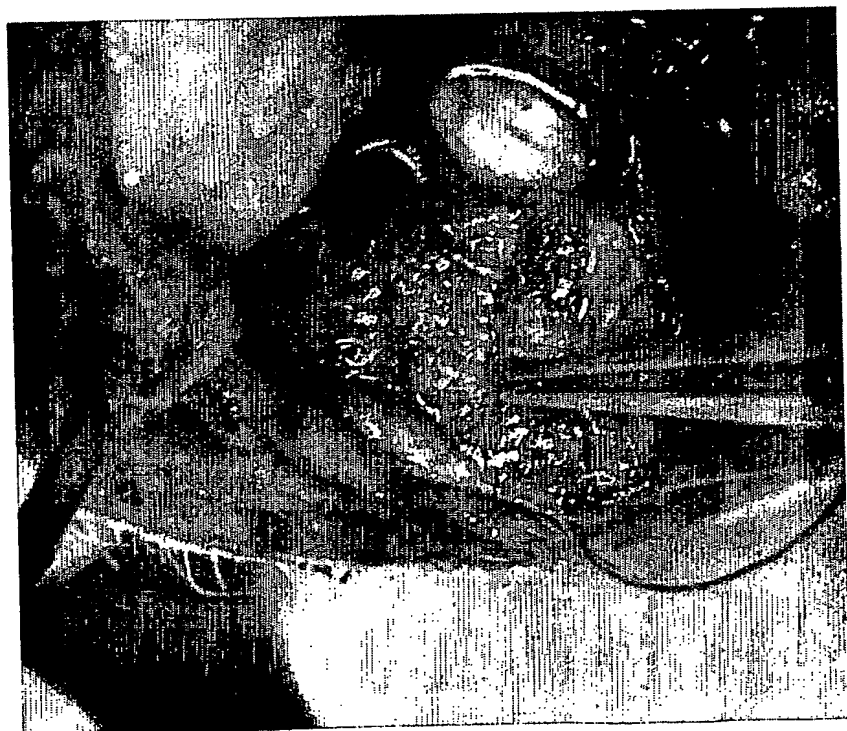
【図 58】



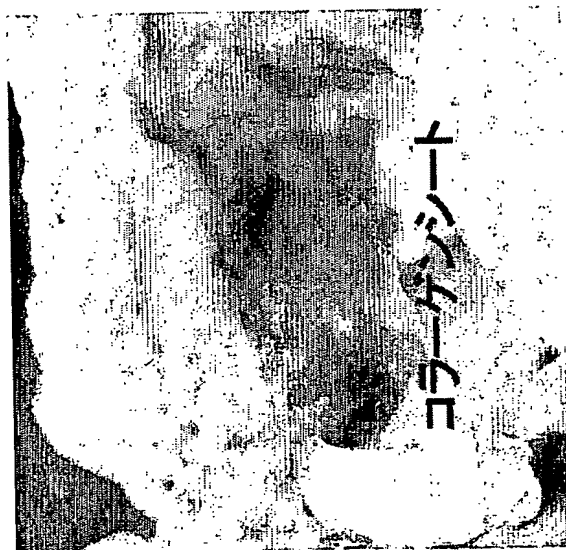
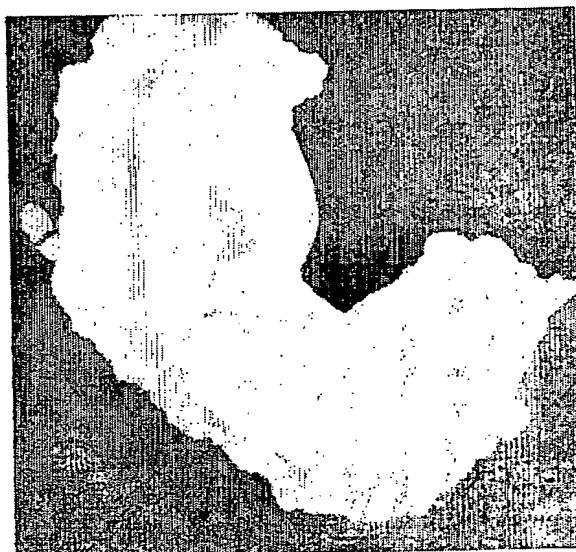
滑膜由来人工組織



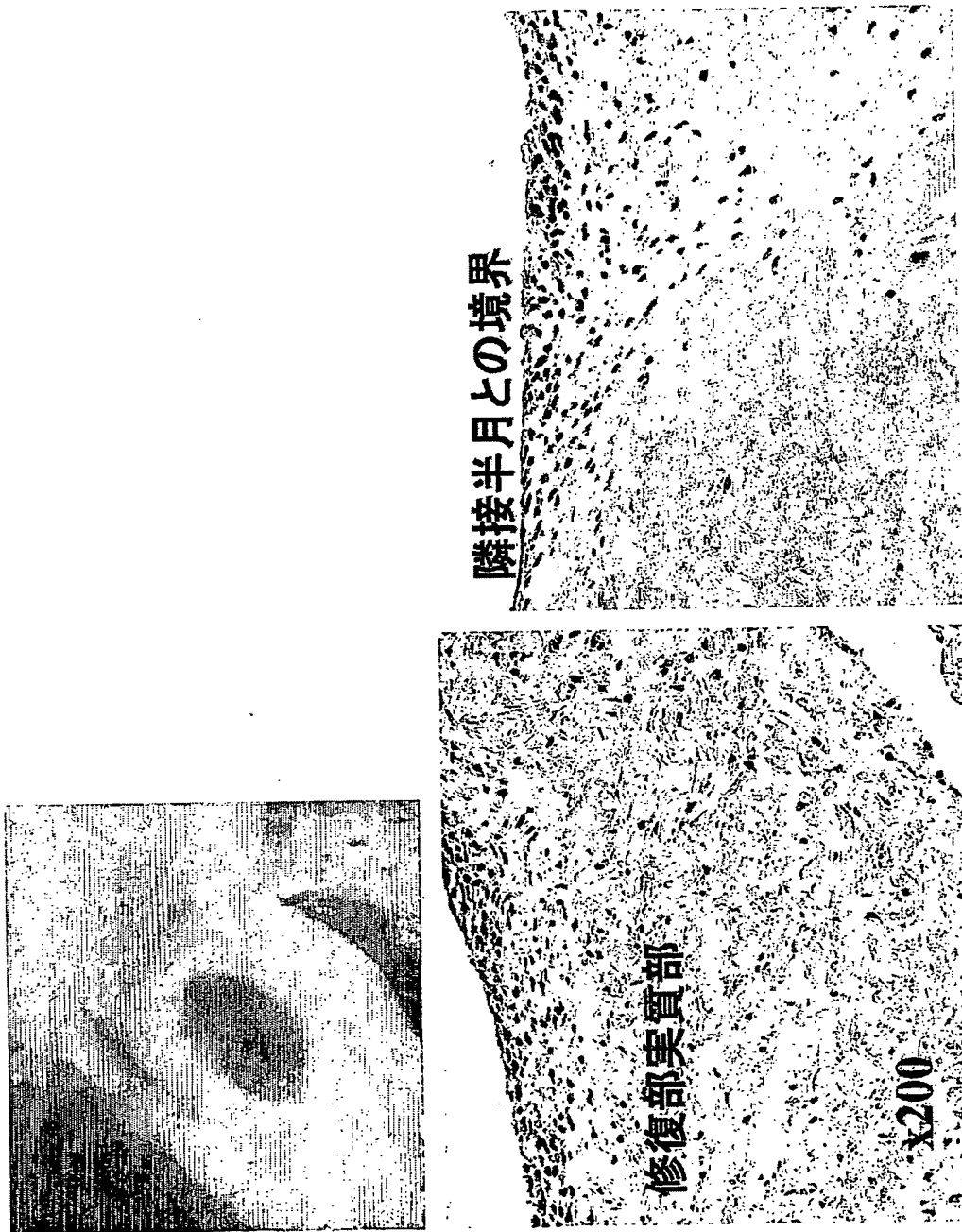
【図 59】



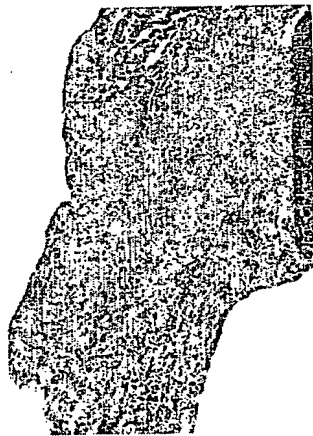
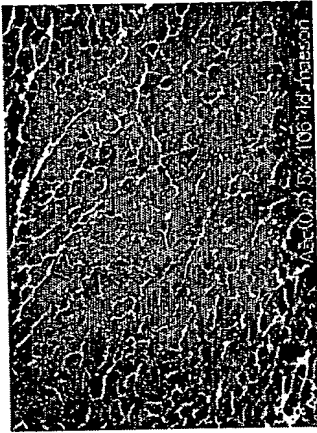
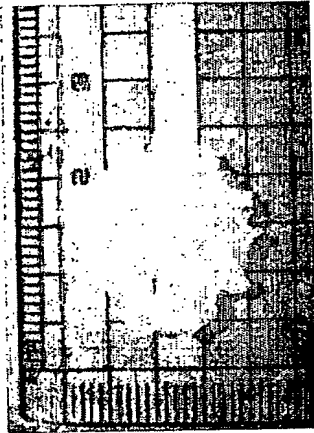
【図 60】



【図61】



【図 62】



A-a

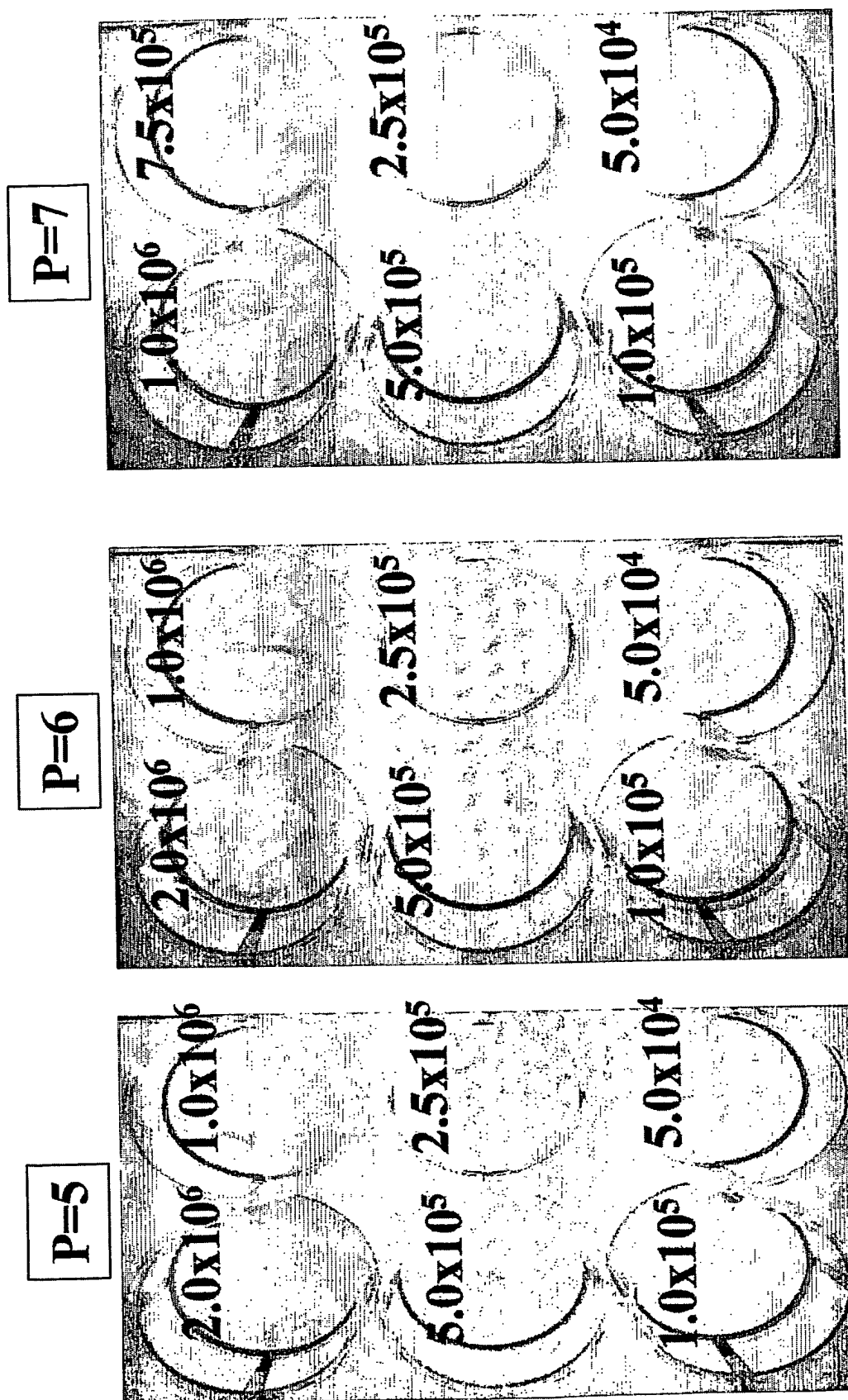


A-b



C

【図 63】

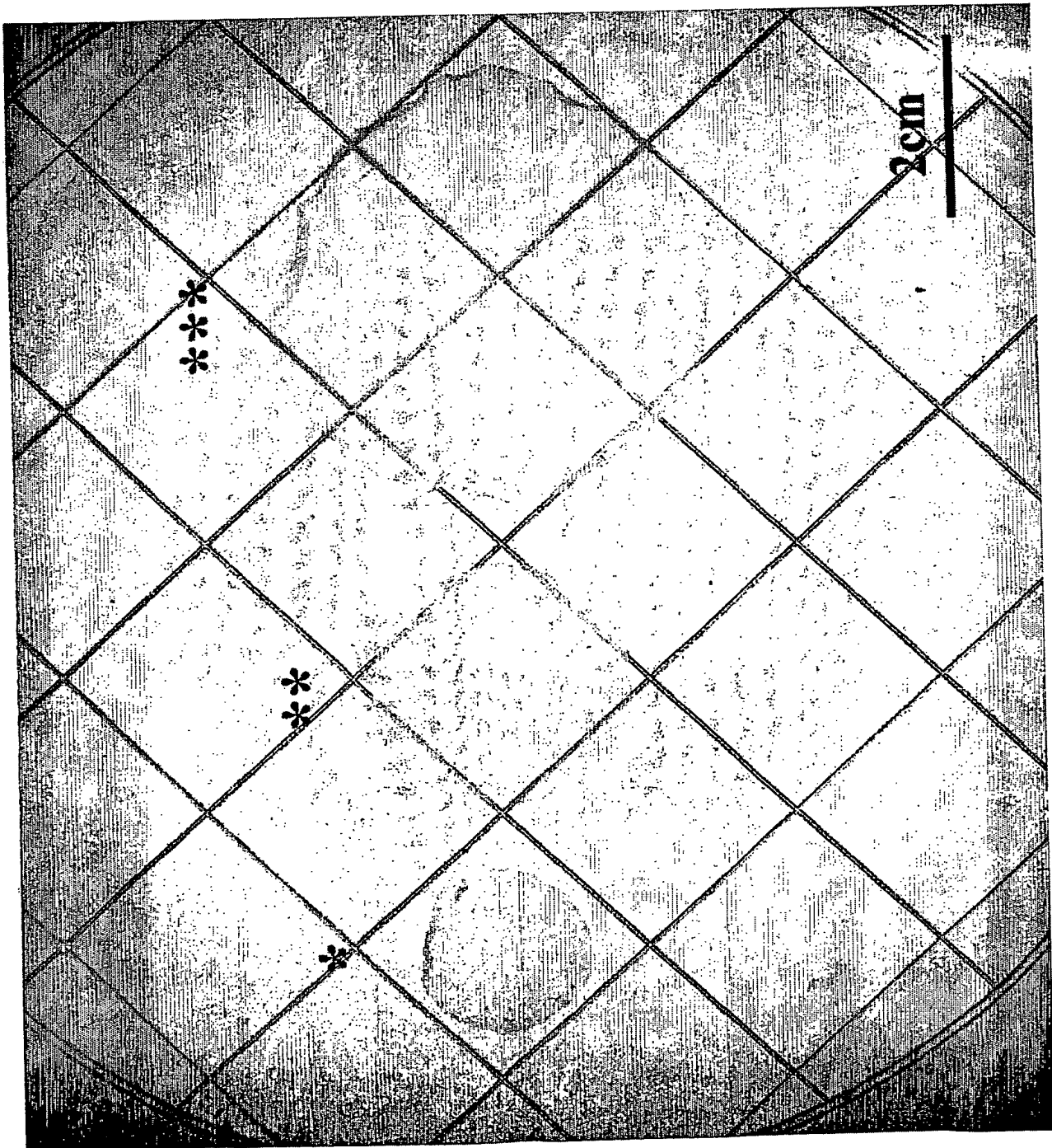


【図 64】

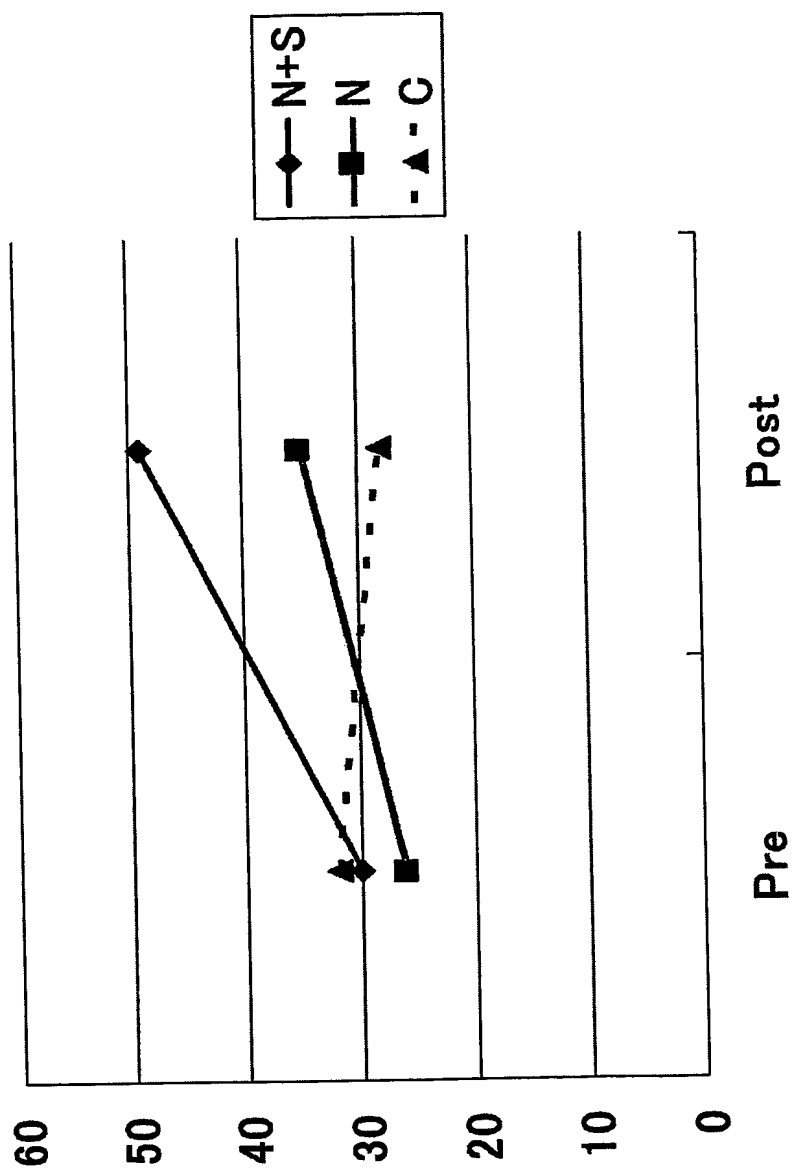
*: 35mm III

** : 60mm III

***: 100mm III



【図 65】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織またはシートを提供することを課題とする。本発明はまた、袋状組織における損傷を治療する場合のような周囲を覆う必要がある状況において、その治療法および医薬を提供することを課題とする。

【解決手段】

本発明において三次元化促進因子を含む培地中での培養という特定の培養条件によって細胞を培養することによって予想外に組織化が進展し、かつ、培養皿から剥離し易いという性質をもつ人工組織を見出したことによって解決された。本発明によって提供される人工組織が、例えば、孔が無い、伸縮性などの性質を持つことによって損傷部位を覆っても抵抗することができる強度を有することによって解決された。本発明はまた、積層化を必要としない移植可能な人工組織の生産方法を提供する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 J104040011
【提出日】 平成16年 6月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004- 58285
【承継人】
 【住所又は居所】 兵庫県西宮市苦楽園二番町 15-12
 【氏名又は名称】 中村 憲正
【承継人代理人】
 【識別番号】 100078282
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 秀策
【選任した代理人】
 【識別番号】 100062409
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安村 高明
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森下 夏樹
 【電話番号】 06-6949-3910
 【連絡先】 担当
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 001878
 【納付金額】 4,200円
【提出物件の目録】
 【物件名】 譲渡証書 1
 【援用の表示】 同日付で提出の特願 2003-285475 の出願人名義変更届
 に添付のものを援用する。
 【物件名】 包括委任状 1
 【援用の表示】 同日付で提出の包括委任状を援用する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-058285
受付番号	50401077142
書類名	出願人名義変更届
担当官	岩谷 貴志郎 7746
作成日	平成16年 7月29日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	504247244
【住所又は居所】	兵庫県西宮市苦楽園二番町 15-12
【氏名又は名称】	中村 憲正

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100078282
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1丁目 2番 27号 クリスタル タワー 15階
【氏名又は名称】	山本 秀策

【選任した代理人】

【識別番号】	100062409
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1丁目 2番 27号 クリ スタルタワー 15階 山本秀策特許事務所
【氏名又は名称】	安村 高明

【選任した代理人】

【識別番号】	100113413
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見 1丁目 2番 27号 クリ スタルタワー 15階 山本秀策特許事務所
【氏名又は名称】	森下 夏樹

特願 2004-058285

出願人履歴情報

識別番号

[502100138]

1. 変更新月日

2002年10月23日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市北区天満4-15-5-302

氏 名

株式会社カルディオ

特願 2 0 0 4 - 0 5 8 2 8 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 2 4 7 2 4 4]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 6 月 2 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県西宮市苦楽園二番町 1 5 - 1 2

氏 名

中村 憲正

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.